



UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Laboratoř růstových regulátorů

**Interakcia signálnych dráh fytochrómov a abiotických
stresov vo fotomorfovení rastlín**

BAKALÁRSKA PRÁCA

Autor: **Bibiána Bučeková**
Študijný program: B1501 Experimentální biologie
Študijný obor: Experimentální biologie
Forma štúdia: Prezenční
Vedúci práce: **Prof. RNDr. Martin Fellner, Ph.D.**
Termín odovzdania práce: 2020

Bibliografická identifikácia

Meno a priezvisko autora	Bibiána Bučeková
Názov práce	Interakcia signálnych dráh fytochrómov a abiotických stresov vo fotomorfogenézií rastlín
Typ práce	Bakalárska
Pracovisko	Laboratoň rústových regulátorů
Vedúci práce	Prof. RNDr. Martin Fellner, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2020
Abstrakt	<p>Predložená bakalárska práca sa zaoberá úlohou signálnych dráh svetla a fotoreceptorov fytochrómov v tolerancii rastlín <i>Solanum lycopersicum</i> k abiotickým stresom, konkrétne k zasoleniu. Cieľom bakalárskej práce bolo zistiť ako prítomnosť fytochrómov ovplyvňuje rast a vývoj rastlín v podmienkach soľného stresu. Teoretická časť obsahuje literárne zdroje, ktoré sa spájajú s problematikou, ktorú bakalárska práca rieši. Počas experimentálnej časti bol použitý genetický prístup spočívajúci vo fyziologickej analýze rastu mutantov. K výskumu boli použité mutantné rastliny defektné v génoch pre fotoreceptory fytochrómy, <i>tr1</i>, <i>fri1</i> a <i>au^w</i>. Experimenty prebiehali v podmienkach <i>in vitro</i>, pri ktorých boli rastliny pestované na kultivačnom médiu s prídavkom NaCl a boli sledované ich rastové reakcie v závislosti na svetelných podmienkach - modrom a červenom svetle, a tme. Experimenty odhalili, že modré alebo červené svetlo prostredníctvom fytochrómov zvyšuje toleranciu hypokotylů paradajky k zasoleniu, zatiaľ čo tolerancia koreňů k zasoleniu sa vplyvom svetla znižuje.</p>
Kľúčové slová	Abiotický stres, fotomorfogenéza, fytochróm, paradajka, <i>Solanum</i> , zasolenie
Počet strán	39
Počet príloh	0
Jazyk	Slovenský (anglický)

Bibliographical identification

Author's first name and surname	Bibiána Bučeková
Title of thesis	Cross-talk between phytochrome and abiotic stress signaling in plant photomorphogenesis
Type of thesis	Bachelor
Department	Laboratory of Growth Regulators
Supervisor	Prof. RNDr. Martin Fellner, Ph.D.
The year of presentation	2020
Abstract	<p>This bachelor thesis study the role of light and photoreceptors phytochromes in tolerance of plants <i>Solanum lycopersicum</i> to abiotic stress, such as salinity. The aim of the bachelor thesis was to find out how the phytochromes affects the growth and development of plants in conditions of salt stress. Theoretical part of the thesis contains literature corresponding with the problems of the bachelor thesis. During experimental part, a genetic approach was used, consisting in physiological analysis of the growth of mutants. For research, mutants plants affected in genes coding for photoreceptors phytochromes were used, <i>tril</i>, <i>fril</i> a <i>au^w</i>. Experiments were performed in conditions <i>in vitro</i> - plants were incubated on a culture medium supplemented with NaCl, and their growth responses were observed as a function of light conditions, such as blue or red light, and the dark. The experiments revealed that blue and/or red light increase tolerance of tomato hypocotyls to salinity, whereas the tolerance of roots to salinity was reduced by the light. This light effects are mediated by phytochrome B1.</p>
Keywords	Abiotic stress, photomorphogenesis, phytochrome, salinity, <i>Solanum</i> , tomato
Number of pages	39
Number of appendices	0
Language	Slovak (English)

Prehlasujem, že som predloženú bakalársku prácu vypracoval(a) samostatne za použitia citovanej literatúry.

V Olomouci dňa

Bibiána Bučková

Pod'akovanie

Veľmi pekne chcem poďakovať vedúcemu bakalárskej práce, prof. RNDr. Martinovi Fellnerovi, Ph.D., za ochotu, čas, pomoc a cenné rady, ktoré mi dokázal poskytnúť po celú dobu vypracovávania mojej bakalárskej práce. Ďalej by som chcela poďakovať i Bc. Jane Glogarovej za vytvorenie príjemného pracovného prostredia.

1 ÚVOD.....	1
2 SÚČASNÁ PROBLEMATIKA	2
2.1 VPLYV SVETLA NA RAST RASTLÍN	2
2.1.1 FOTOMORFOGENÉZA	2
2.1.2 FOTORECEPTORY	3
FYTOCHRÓMY	4
FOTORECEPTORY MODRÉHO SVETLA	6
KRYPTOCHRÓMY	6
FOTOTROPÍNY	7
FOTORECEPTORY RODINY ZEITLUPE	9
FOTOMORFOGENICKÉ MUTANTY PARADAJKY	9
2.2 VPLYV ABIOTICKÉHO STRESU NA RASTLINY	11
2.3 VPLYV SVETLA NA SCHOPNOŠŤ RASTLÍN TOLEROVAŤ STRES VYVOLANÝ ZASOLENÍM	13
3 MATERIÁL A METODIKA	17
3.1 RASTLINNÝ MATERIÁL	17
3.2 PRÍPRAVA MÉDIA	17
3.3 VÝSEV SEMIEN	17
3.4 PRENOS KLÍČKOV	18
4 VÝSLEDKY	20
4.1 RASTOVÉ REAKCIE MUTANTA <i>TRI1</i>	21
4.2 RASTOVÉ REAKCIE MUTANTA <i>FRI1</i>	23
4.3 RASTOVÉ REAKCIE MUTANTA <i>AU^w</i>	26
5 DISKUSIA	29
6 ZÁVER	32
7 CITOVANÁ LITERATÚRA	34
8 ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK	39

1 Úvod

Rastliny sú sesilné, autotrofné organizmy neschopné meniť svoju polohu a lokáciu. Ich celý životný cyklus je silne ovplyvnený neustále sa meniacimi svetelnými podmienkami. Konkrétne dĺžkou, kvalitou alebo intenzitou dopadajúceho žiarenia. Aby bolo možné tieto dynamicky sa striedajúce podmienky vnímať a reagovať na ne, rastliny vlastnia niekoľko rodín fotoreceptorov, ktoré monitorujú svetlo v rozsahu 350 nm až 750 nm, pričom každý fotoreceptor má svoje vlastné absorpčné spektrum. Fytochrómy snímajú červené a dlhovlnné červené svetlo. Ďalej boli identifikované 3 triedy fotoreceptorov UV-A a modrého svetla a to: kryptochrómy, fototropíny a fotoreceptory rodiny Zeitlupe. Rastliny musia neustále reagovať na zmeny životného prostredia pri zachovaní vývojových a rastových procesov, aby prežili ďalšiu generáciu. Tieto zmeny nielen, že spomaľujú ich životné funkcie, môžu viesť nakoniec i ku úhynu rastliny. Dôležitým úkonom v živote rastliny je teda účinná reakcia na stres. Takéto stresové situácie nevytvárajú pre rastliny len infekcie a byľinožravce, ale aj abiotické vplyvy napr. sucho, teplo, chlad, nedostatok živín, či nadbytok soli alebo toxických kovov v prostredí. Globálnym problémom s vážnym dopadom na poľnohospodárstvo je vysoký obsah soli v pôde. Dochádza k vyvolaniu soľného stresu a preto je miera zasolenia pôdy dôležitým faktorom vo vývoji rastlín. Medzi spolupáchateľov, ktorí ovplyvňujú životný cyklus rastlín teda patria aj soľný stres a svetelné podmienky.

Obecným cieľom bakalárskej práce, bolo zistiť, ako prítomnosť fytochómov, teda fotoreceptorov červeného svetla ovplyvňuje rast a vývoj rastlín v podmienkach soľného stresu. K výskumu boli použité rastliny *Solanum lycopersicum*, ich kultivary a od nich odvodené mutantné rastliny defektné v génoch pre fotoreceptory fytochrómy. Teoretická časť obsahuje literárne zdroje, ktoré sa spájajú s problematikou, ktorú bakalárska práca rieši. Počas experimentálnej časti boli realizované experimenty v podmienkach *in vitro*. Bol použitý genetický prístup, spočívajúci vo fyziologickej analýze rastu mutantov *tril*, *fri1* a *au^w* pri zasolení (NaCl) a v závislosti na svetelných podmienkach - modrom a červenom svetle, a tme. Experimenty boli vykonávané v Skupine molekulárnej fyziológie, ktorá je súčasťou Laboratória rastových regulátorov UP Olomouc a Ústavu experimentálnej botaniky AVČR.

2 Súčasná problematika

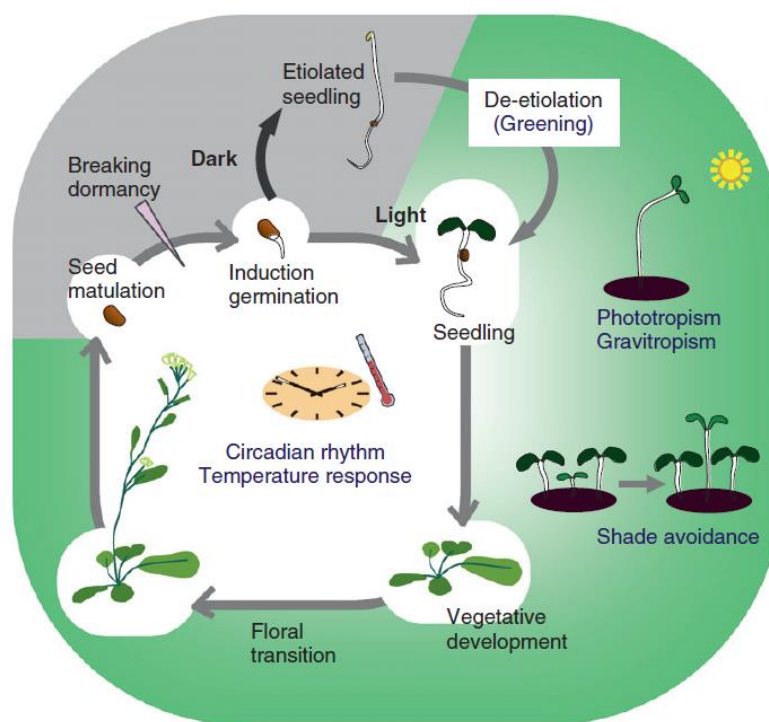
2.1 Vplyv svetla na rast rastlín

Svetlo patrí medzi základné zdroje energie na našej planéte. Fotoautotrofné organizmy, medzi ktoré patria i rastliny, získavajú energiu fixáciou energie žiarenia v procesoch fotosyntézy. Počas fotosyntézy dochádza k fotochemickým reakciám, ktoré premieňajú svetelnú energiu na chemickú energiu potrebnú k premene oxidu uhličitého a vody na uhlíohydráty (Butler, 1973).

Príroda ako živý systém poskytuje súbor signálov počas denného i nočného cyklu vrátane zmien teploty, kvality a množstva svetla. Rastliny využívajú fotoperiodický senzor k reakciám na tieto podnety a tak reagujú na ročný cyklus. Rastliny majú ďalej schopnosť rozoznať dĺžku dňa od noci a v dôsledku tak reagovať na ročné obdobia. Tento jav sa nazýva fotoperiodizmus a je dôležitý pri regulácii procesov dejúcich sa v rastline (Procházka *et al.*, 1998). Fotoperiodizmus je definovaný ako cirkadiánnny rytmus kombinovaný so svetelnou signalizáciou a cirkadiánne hodiny vytvárajú vnútorný odhad času, ktorý synchronizuje biologické udalosti s vonkajšími cyklami deň-noc (Dodd *et al.*, 2005).

2.1.1 Fotomorfogenéza

Ako už bolo spomenuté, fotosyntéza poskytuje základné suroviny potrebné pre rast rastlín. Rastliny však obsahujú fotomorfogénne pigmenty, ktoré modulujú a riadia ich vývoj. Rastliny teda nie sú len citlivé na kvalitu svetla, ale sú taktiež schopné sa adaptovať k jeho množstvu a spôsoby adaptácie je možné vidieť na Obr.1. Rastliny počas vývoja v tme prežívajú zo zásob v semenách. V tomto prípade rastú väčšinou v tme (D) a tento proces sa nazýva etiolizovaný rast alebo skotomorfogenéza. Dochádza k zvýšeniu šance sadenice rýchlo dosiahnuť povrch pôdy. Keď sa rastlina dostane na povrch pôdy začína proces deetolizácie a dochádza k zmene vývoja rastliny, ktorý sa nazýva fotomorfogenéza (Josse and Halliday, 2008). Fotomorfogenéza je teda definovaná ako vývojová odpoveď rastliny na informáciu podávanú svetlom. Existujú informácie týkajúce sa prítomnosti svetla, smeru svetla, intenzity svetla, trvania svetla, spektrálnej kvality a polarizácie. Fotosenzorické systémy, ktoré sú využívané počas fotomorfogenézy spájajú absorpciu fotónov s viditeľnými reakciami. Pri regulácii fotomorfogenézy spolupracujú rôzne receptory z čoho vyplýva, že rôzne druhy rastlín môžu mať rozdielnu reguláciu tohto procesu (Shinkle, 2008).



Obr. č. 1: Fotomorfofenéza *Arabidopsis thaliana*, Prevzaté od Kami et al., 2010

Povaha rastovej odpovede na svetlo závisí od tkaniva a je možné načrtnúť „typické“ reakcie rastu rôznych orgánov rastlín. Stonky rastúce v tme majú tendenciu vyvíjať sa veľmi dlhé a tenké. V podmienkach bez prístupu svetla, teda v tme, dochádza k rapídному predĺžovaniu stoniek a to pomerne v krátkom čase. Bez svetla je vývoj listov pozastavený alebo potlačený a listy ostávajú drobné a bledé, pretože neobsahujú chlorofyl. Existujú však výnimky, ako napríklad listy rebarbory, ktoré sa predlžujú, ale ostávajú zvinuté. Po ožiarení viditeľným svetlom pri fotomorfofenéze dochádza k spomaleniu predĺžovania stonky, listy sa rozvinú a rozšíria a dochádza k syntéze chlorofylu. Svetlo všeobecne inhibuje predĺžovanie koreňov. Korene niektorých rastlín pestovaných v úplnej tme nereagujú na gravitáciu, ale rastú náhodným smerom. Až po vystavení svetlu začnú reagovať gravitopicky (geotropicky) a rastú smerom nadol. Rastlina teda vplyvom svetla mení svoju formu na takú, ktorá je schopná fotosyntézy (Cosgrove, 1994).

2.1.2 Fotoreceptory

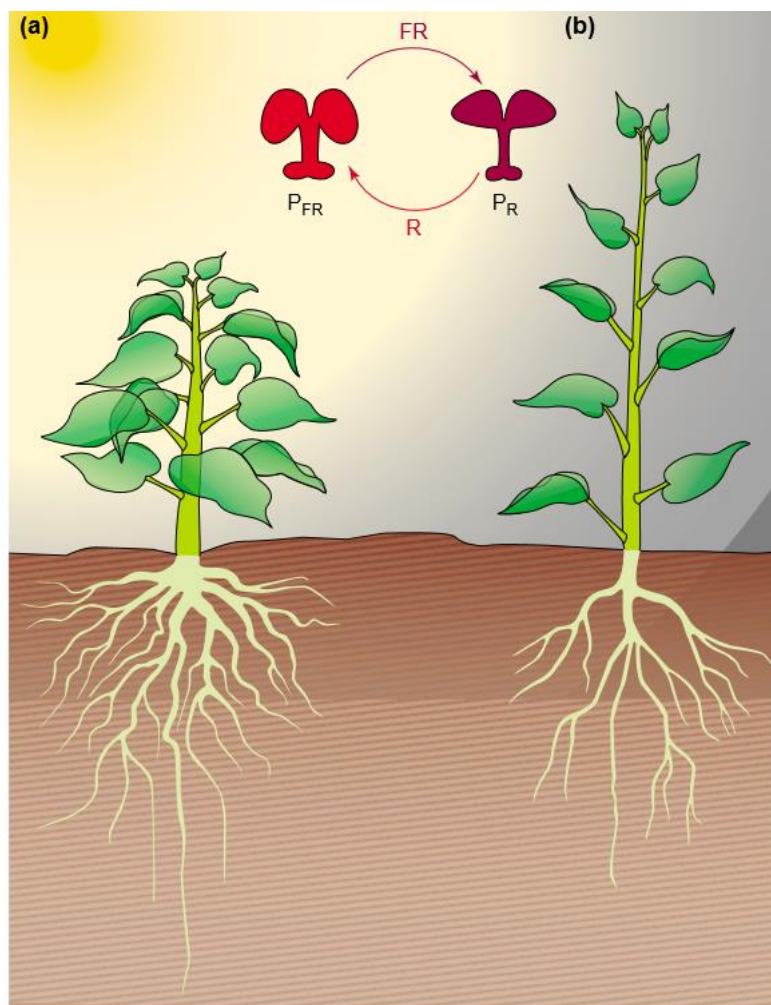
V dôsledku veľkého množstva signálov v okolí, si rastlina vytvorila sofistikovaný systém špecifických fotoreceptorov k prenosu signálu a vyvolania vhodnej odpovede (Procházka et al., 1998; Briggs and Olney, 2001). Fotoreceptory modulujú rast a vývoj rastlín počas celého ich životného cyklu. Svetelné reakcie sú rozdelené na reakcie, ktoré si vyžadujú nepretržitý

prísun svetla a reakcie, ktoré sú vyvolané svetelnými impulzmi. (Kami *et al.*, 2010). Molekulami fotoreceptorov rastlina zachytáva a využíva fotóny svetla ku modulácií biologickej aktivity. Absorpčné vlastnosti fotoreceptorov sú zhodné so spektrom svetla, ktoré na ne dopadá, teda so slnečným spektrom v rozsahu 350 nm až 750 nm. A každý fotoreceptor má svoje vlastné absorpčné spektrum. Je známych niekoľko tried fotoreceptorov: xanthopsíny, fytochrómy, receptory modrého svetla, rodopsíny a ďalšie (Möglich *et al.*, 2010). Najmenej tri druhy fotoreceptorov rastlina využije ku dosiahnutiu fotomorfogenézy (Kendrick and Kronenberg, 1994).

Fytochrómy

Fytochromy sú 120 kDa peptidy, apoproteíny, ktoré sa kovalentne viažu s chromofórom, čo je lineárny tetrapyról nazývaný fytochrómbilín a dohromady tvorí komplex nazývaný holoprotein. Štúdie ukázali, že fytochrómy, ktoré riadia procesy kvitnutia a klíčenia semien, sa vplyvom červeného svetla (R) (vlnová dĺžka v rozpätí 650-680 nm) premieňajú v biologicky aktívnu formu (Pfr) a vplyvom dlhovlnného červeného svetla (FR) (vlnová dĺžka v rozpätí 710-740 nm) sa opäť inaktivujú na formu Pr ako je možné vidieť na Obr. 2 (Briggs and Olney, 2001).

Vlastnosť fotoreversibility týchto fotoreceptorov vplyvom červeného a dlhovlnného červeného svetla umožnila spektrofotometricky izolovať a identifikovať tento pigment - fytochróm. Reguluje vývojové procesy ako sú: klíčenie semien citlivých na svetlo, etolizácia, zvýšená syntéza chlorofylu, znížená rýchlosť predlžovania stoniek, podpora rastu listov, fotoperiodizmus a kvitnutie (Jones *et al.*, 2013).



Obr. č. 2: Fytochrómový fotocykľus. Konverzia foriem fytochrómov, ktorá nastáva po excitácii červeného a dlhovlnového červeného svetla, ktoré indukujú izomerizáciu v chromofóre fytochrómbilínu a porovnanie fenotypu rastlín rastúcej na svetle (a) a v tme (b). Prevzaté od Morelli and Ruberti, 2002

Vo vyšších rastlinách sú fytochrómy kódované malými rodinami génov, napríklad päť členov (phyA až phyE) v *Arabidopsis*. Ďalej sa klasifikujú na svetlo labilný fytochróm typu I (phyA) a svetelne stabilné fytochrómy II (phyB až phyE), medzi ktorými phyA je zodpovedný za snímanie FR svetla a phyB až phyE hrajú úlohu vo fotomorfogénnom vývoji sprostredkovanom červeným svetlom (Tripathi *et al.* 2019). PhyA a phyB sú najhojnejšie zastúpené fytochrómy, rovnako sú i najdôležitejšími fytochrómami pre fotomorfogénu. Aj keď sú ich absorpčné spektrá takmer rovnaké, môžu regulovať reakcie na rôzne svetelné podnety. Medzi fytochrómami má phyB dominantnú úlohu v regulácii reakcie na vyhýbanie sa tieňom (Legris *et al.*, 2019).

Svetlo, ktoré zasiahne fytochrómy, podporuje etiolizáciu. Táto počiatočná reakcia na svetlo prebieha dokonca aj v zlých svetelných podmienkach, ktoré sa vyskytujú v hlbokom tieni. V prostrediach s vysokou hustotou rastlín pomer R a FR (R/FR) klesá, pretože zelené

tkanivá absorbujú hlavne R a modré svetlo (B) a prenášajú alebo odrážajú FR a teda fytochróm vyvolá reakciu na vyhýbanie sa tieňom u zelených sadeníc. Podporuje sa predlžovanie stoniek, listy menia svoju polohu a anatómiu, mení sa koreňová architektúra. Teda pri vysokom množstve FR je etiolizácia riadená phyA a neskôr pri vysokom množstve R riadenie tohto procesu preberá phyB (Legris *et al.*, 2019).

Fotoreceptory modrého svetla

Darwin už v roku 1881 zdokumentoval odpoveď rastlín na modré svetlo, keď objavil tzv. fototropnú odpoveď indukovanú modrým svetlom (Darwin, 1881). Uvádza sa, že modré svetlo (vlnová dĺžka v rozmedzí 400 až 500 nm) má inhibičný účinok na predlžovací rast rastlín, stimuluje rozširovanie listov, fotomorfogenézu, otváranie prieduchov, pohyb chloroplastov, indukuje fotosyntézu, fotosyntézu a akumuláciu pigmentu (Naznin *et al.*, 2019).

V rámci molekulárno-genetických štúdií s modelovým organizmom *Arabidopsis*, boli identifikované štyri receptory modrého svetla: kryptochróm 1 a 2 (CRY1 a CRY2) a fototropíny 1 a 2 (PHOT1 a PHOT2 (Lin, 2002).

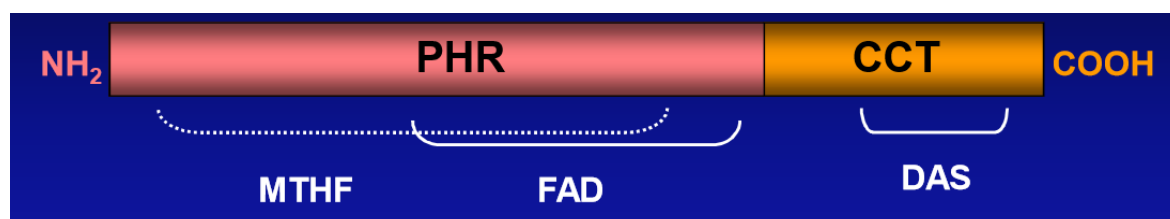
Počas deetolizácie modré svetlo rýchlo a silne inhibuje predlžovanie hypokotylu. Štúdie *Arabidopsis*, ktoré sa uskutočnili pomocou elektronického snímania a analýzy obrazu pomocou počítača, ukázali, že k inhibícii dochádza v dvoch geneticky nezávislých fázach, pričom prvá sa začína do 30 sekúnd od osvetlenia. V prvej fáze je za počiatočnú rýchlu inhibíciu do značnej miery zodpovedný PHOT1. Dochádza ku aktivácii aniónových kanálov, ktoré prechodne depolarizujú plazmovú membránu. Táto reakcia je skorou udalosťou v kryptochrómovej signálnej ceste a vedie k inhibícii rastu, ktorá nahradí prechodnú fázu závislú od fototropínu (Folta and Spalding, 2001).

Kryptochrómy

Kryptochrómy sú fotoreceptory, ktoré regulujú cirkadiánne hodiny rastlín a živočíchov. U rastlín kryptochrómy regulujú fotomorfogenézu v reakcii na modré svetlo alebo ultrafialové svetlo (UV-A) (vlnová dĺžka v rozmedzí 320 až 400 nm). Kryptochrómy, sú svetom pravdepodobne vývojovým potomkom DNA fotolyáz, čo sú svetlom aktivované enzýmy na opravu DNA, a sú rozdelené do troch skupín - rastlinné kryptochrómy, živočíšne kryptochrómy a proteíny CRY-DASH. Kryptochrómy a fotolyázy majú podobné trojrozmerné štruktúry charakterizované α/β doménou a špirálovitou doménou. Štruktúra tiež zahŕňa chromofór a flavín-adenín-dinukleotid (FAD) (Lin and Todo, 2005).

Primárna fotoreakcia kryptochrómu je redoxná reakcia zahŕňajúca prenos elektrónov. Pri reakcii na opravu DNA sa polypeptidový reťazec fotolyázy viaže na DNA, svetelná energia zachytená chromofórom získavajúcim svetlo sa prenáša na katalytický chromofór FAD a jeden elektrón sa potom preniesie z FAD na cyklobutánový kruh pyrimidínového diméru za vzniku dvoch pyrimidínov. Alternatívne môže dôjsť k prenosu elektrónov medzi flavínom a proteínovou časťou kryptochrómu, čo má za následok konformačné zmeny vo fotoreceptore. V oboch prípadoch môže prenos elektrónov viesť k biochemickým modifikáciám, ako je fosforylácia kryptochrómu. Bolo však zistené, že kryptochrómom CRY1 a CRY2 fotolyázová aktivita chýba. (Lin, 2002).

Presnejšia štruktúra kryptochrómu na Obr. 3 obsahuje dve domény: N-terminálnu homológnu oblasť fotolyázy (PHR), ktorá sa viaže na FAD, umiestnenú v prístupovej dutine FAD a 5,10-metenyltetrahydrofolát (MTHF) a C-koncovú kryptochrómovú C-koncovú predĺženú doménu (CCT) (Liu, 2011).



Obr. č. 3: Schematická štruktúra kryptochrómu. Prevzaté od Taiz and Zeiger, 2010.

Kryptochrómy *Arabidopsis* ďalej spolupracujú s fytochrómami pri regulácii rôznych svetelných reakcií, vrátane regulácie predlžovania buniek a fotoperiodizmu a spolu s fototropínmi sprostredkujú reguláciu otvárania prieduchov. Ďalej kryptochrómy samé o sebe sprostredkujú fotoperiodickú reguláciu kvitnutia, akumuláciu antokyanov a ukázalo sa že kryptochrómy hrajú zásadnú úlohu v regulácii rastu elongácie primárnych koreňov na modrom svetle (Li and Yang, 2007).

Nakoniec je potrebné spomenúť, že v paradajke jedlej (*Solanum lycopersicum*) sú kryptochrómy kódované multigénovou rodinou obsahujúcou CRY1a, CRY1b, CRY2 a CRY3 (Fantini *et al.*, 2019).

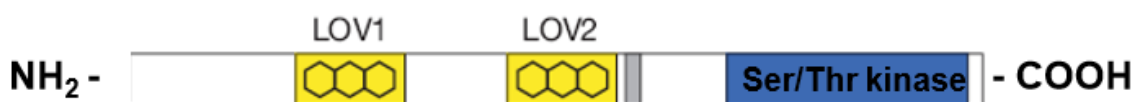
Fototropíny

Fototropizmus rastlín, teda schopnosť ohýbať sa smerom k svetlu alebo od neho, je ovládaný prevažne fotoreceptormi modrého svetla, fototropínmi. Darwin navrhol, že prenosná látka produkovaná na špičke rastliny je zodpovedná za vyvolanie fototropných pohybov. Viedlo

to k prvému objaveniu rastlinného hormónu auxínu a neskôr k identifikácii fotoreceptorov modrého svetla pre fototropismus.

Okrem fototropizmu, regulujú fototropíny kľúčové fyziologické reakcie, ktoré sú pod kontrolou svetla, vrátane negatívnych fototropizmov koreňov, akumulácie chloroplastov, otváranie prieduchov, rozširovania listov a ranného predlžovacieho rastu (Li *et al.*, 2015).

Fototropín pozostáva i podľa Obr. 4 z dvoch funkčných oblastí: fotosenzorickej domény na N-konci a serín/threonín (Ser/Thr) kinázovej domény na C-konci. N-terminálna fotosenzorická doména obsahuje dve domény, ktoré sa nazývajú LOV (Light-Oxygen-Voltage). Na každú doménu LOV sa viaže jeden flavín mononukleotidu (FMN) a funguje ako senzor modrého svetla. Doména LOV2 je nevyhnutná pre reguláciu aktivácie domény C-terminálnej kinázy (Komatsu *et al.*, 2014).



Obr. č. 4: Schematická štruktúra fototropínu. Prevzaté od Taiz and Zeiger, 2010.

Gén *NPH1* kóduje 120 kDa Ser/Thr proteínkinázu, ktorá ako sa predpokladá, funguje ako fotoreceptor pre fototropizmus. Fotofyziologické, genetické a biochemické dôkazy naznačujú, že *NPH1* je fotoreceptor, ktorý podlieha autofosforylácii závislej od modrého svetla. Tieto výsledky ukazujú, že *NPH1* je fotosenzitívna autofosforylačná proteínkináza (Christie *et al.*, 1998). Boli izolované fototropizmové mutanty *Arabidopsis* s označením *nph1* až *nph4*. Mutované alely *nph1* generované rýchlym ožarovaním neutrónmi, nevytvárali známe fototrópne odpovede, čo dokazuje, že proteín *NPH1* je nevyhnutný pre všetky fototrópne signálne cesty a bol nazvaný PHOT1 (Huala *et al.*, 1997).

Ďalej boli u *Arabidopsis* identifikované aj iné proteíny obsahujúce doménu LOV. Ich LOV domény obsahujú všetky konzervované zvyšky viažuce sa na flavín nachádzajúce sa v LOV doménach fototropínu. Tieto proteíny môžu tiež pôsobiť ako fotoreceptory (Briggs and Christie, 2002).

Rastlinne špecifický kinázový fototropín (PHOT) je receptorom modrého svetla pre pohyby chloroplastov. Vo väčšine rastlín sa pozoruje pohyb, fotorelokácia chloroplastov, vyvolaný modrým svetlom. Chloroplasty sa pohybujú smerom k oblastiam, ktoré sú ožiarené slabým svetlom, kde účinne absorbujú svetlo a teda uniknú z oblastí ožiarených silným svetlom (Kong and Wada, 2016). *Arabidopsis* obsahuje dva fototropíny: PHOT1 a PHOT2. Oba fototropíny sú lokalizované na plazmatickej membráne. Počas pohybu

chloroplastov sa fototropíny, najmä PHOT2, spájajú nielen s plazmatickou membránou, ale aj s vonkajšou membránou chloroplastov (Komatsu *et al.*, 2014).

Prieduchy sa otvárajú v reakcii na lúč slabého modrého svetla, čiastočne i na červenom svetle. Fototropíny PHOT1 a PHOT2, vnímajú modré svetlo a prenášajú signál modrého svetla do plazmatickej membránovej H⁺-ATPázy, ktorá riadi otváranie prieduchu (Yamauchi *et al.*, 2016).

Fotoreceptory rodiny Zeitlupe

Rodina Zeitlupe (ZTL) je charakterizovaná funkciou pre reguláciu cirkadiánnych hodín. Podľa Obr. 5, môžeme vidieť, že N-koniec obsahuje doménu LOV, ktorá má podobnosť s doménou, ktorá viaže flavín u fototropínov. Zvyšok ZTL pozostáva z F-boxu a šiestich opakujúcich sa domén KELCH. Tieto dve domény pôsobia spoločne, aby priviedli cieľové proteíny do väčšieho komplexu Skpl-Cullin-F-box (SCF) na ubiquitináciu a následnú degradáciu v proteazóme (Somers *et al.*, 2004). Proteín F-boxu je nevyhnutný na udržanie normálnej cirkadiánnej periódy regulovaním degradácie proteínu centrálnych hodín, ktorý je závislý od proteazómu (Kim *et al.*, 2007).



Obr. č. 5: Schematická štruktúra fotoreceptorov rodiny Zeitlupe. Prevzaté od Taiz and Zeiger, 2010.

Gigantea (GI) je jedinečný rastlinný proteín, ktorý sa podieľa na udržiavaní a kontrole mnohých aspektov fyziológie a vývoja rastlín. GI prostredníctvom neznámeho mechanizmu stabilizuje proteín F-box ZTL a to v prítomnosti modrého svetla, teda počas dňa. Počas noci dochádza k destabilizácii a uvoľneniu sa GI, ktorý je kľúčový regulátor cirkadiánnych hodín (Cha *et al.*, 2017).

Fotomorfofogenické mutanty paradajky

Fotomorfofogenéza paradajky jedlej (*Solanum lycopersicum* L.) je študovaná napríklad pomocou mutantov, ktoré obsahujú modifikáciu vo svojom zložení fotoreceptorov alebo v prenose signálu. Medzi tieto mutanty patria i mutanty v receptoroch červeného svetla, ktoré sú u paradajky kódované malou rodinou génov: phyA, phyB1, phyB2, phyE a phyF (Kendrick *et al.*, 1997).

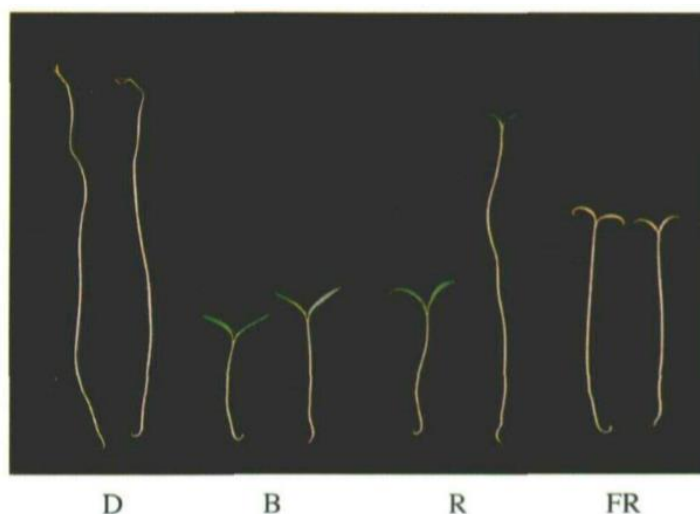
Identifikácia mutácií v génoch kódujúcich fytochrómové apoproteíny viedla k rýchlemu pokroku v chápaní úloh jednotlivých fytochrómov. Mutanty s deficitom phyB sú predlžované pri FR, ale nie pri R. Naopak mutanty s nedostatkom phyA sú voči FR slepé,

ale reagujú na červené svetlo. Druhá trieda mutantov s nedostatkom fytochrómu má predĺžený fenotyp pod R aj FR, čo zodpovedá neprítomnosti aktivít phyA a phyB (Terry, 1997).

Preto boli izolované napríklad mutanty ako *aurea* (*au*), u ktorého nedochádza k biosyntéze fytochromových chromofórov, z čoho vyplýva, že neobsahuje funkčné fytochrómy a teda nemá obe zložky odozvy v oblastiach R a FR spektra. Všetky fytochrómy využívajú rovnaký chromofór, ktorý je syntetizovaný jednou cestou, kde prvým krokom je syntéza biliverdínu (BV) IX α z hemu, enzýmom, ktorý uskutočňuje túto reakciu je hemoxygenáza. Následne BV IX α je redukovaný na 3Z- phytochrombilín (P ϕ B) enzýmom P ϕ B syntáza. Nakoniec je posledným krokom izomerizácia 3Z-P ϕ B na 3E-P ϕ B izomerázou P ϕ B (Terry and Kendrick, 1996). FR-necitlivý (*fri*) mutant je nedostatočný v phyA a dočasne R-necitlivý (*tri*) mutant je deficitný v phyB1 (Kerckhoffs *et al.*, 1997).

Hlavnou charakteristikou *aurea* mutantov je svetlo zelená farba listov, ktorá koreluje so zníženým obsahom chlorofylu. Ďalšími bežnými charakteristikami sú dlhý hypokotyl, najmä pod R a FR, a znížený obsah fytochrómu.

Medzi fenotypy mutantantov *tri1* a *tri3* rastúcimi v tme a pod FR nie je žiadny rozdiel. Hypokotily mutantov *tri1* a *tri3* sú pod modrým svetlom mierne predĺžené v porovnaní s ich príslušnými nemutovanými kultivarmi, čo je možné vidieť na Obr. 6. Čo sa týka fenotypu rastúceho na červenom svetle, sú mutanty v porovnaní s kontrolnými genotypmi charakterizované dlhším hypokotylom, menším množstvom antokyanínov a menšími, tmavozelenými kľúčnymi listami.



Obr. č. 6: Porovnanie fenotypov paradajok, ktoré rástli pod príslušným svetlom 7 dní. Napravo sa nachádza mutant *tri* a naľavo divoký typ. Prevzaté od Van Tuinen *et al.*, 1996

Mutanty *fri1* a *fri2* pestované pod FR sa fenotypovo nelíšia od rastlín pestovaných v D. Hypokotyly na podľa Obr. 7 sú predĺžené, apikálne háčiky sa neuzatvárajú a kľúčne listy sa nerozširujú. Nemutované rastliny pestované v FR vykazujú menšiu inhibíciu rastu hypokotyly ako pod modrým a červeným svetlom a kľúčne listy zostávajú žlté, ale sú úplne expandované. V porovnaní s kontrolnými rastlinami je hypokotyl mutantov *fri1* a *fri2* mierne predĺžený pod modrým a červeným svetlom (Van Tuinen *et al.*, 1996).



Obr. č. 7: Porovnanie fenotypov paradajok, ktoré rástli 7 dní pod príslušným svetlom. Napravo sa nachádza mutant *fri* a naľavo divoký typ. Prevzaté od Van Tuinen *et al.*, 1996

2.2 Vplyv abiotického stresu na rastliny

Rastliny žijú v dynamicky sa meniacom prostredí, ktoré ich často ovplyvňuje nepriaznivými environmentálnymi podmienkami, medzi ktoré patrí biotický stres, napríklad patogénna infekcia a byľinožravce, a abiotický stres, ako je sucho, teplo, chlad, nedostatok živín a nadbytok soli alebo toxických kovov, ako je hliník, arzén a kadmium v pôde. Stresy vytvorené v dôsledku sucha, soli a teploty sú hlavnými environmentálnymi faktormi, ktoré ovplyvňujú geografické rozmiestnenie rastlín v prírode a obmedzujú ich produktivitu. Nepriaznivé účinky týchto abiotických stresov sú znásobené i zmenou klímy (Zhu, 2016).

Rastliny potrebujú na rast energiu (svetlo), vodu, uhlík a minerálne látky. Abiotické stresy sú podmienky prostredia, ktoré znižujú rast a výnos pod optimálnou úrovňou. Reakcie rastlín na abiotické stresy sú dynamické a komplexné, závisia od tkaniva alebo orgánu postihnutého stresom. Metabolizmus je ovplyvňovaný tým, ako sa stres zväčšuje. V reakcií

na stres teda dochádza i k postupným a komplexným zmenám v metabolizme, čo vedie k obmedzovaniu rastu rastliny a pri pretvárajúcom strese až k smrti rastliny (Cramer *et al.*, 2011).

Reakcie rastlín k abiotickým stresom sú často sprostredkované rastlinnými hormónmi, ktoré môžu pôsobiť buď v mieste syntézy alebo po ich transporte na určité miesto v rastline. Medzi hormóny, ktoré hrajú významnú úlohu v odpovediach rastlín k stresom patrí kyselina abscisová (ABA), etylén, cytokinín (CK), auxín (IAA), gibberellín (GA), jasmonát (JA) (Peleg and Blumwald, 2011).

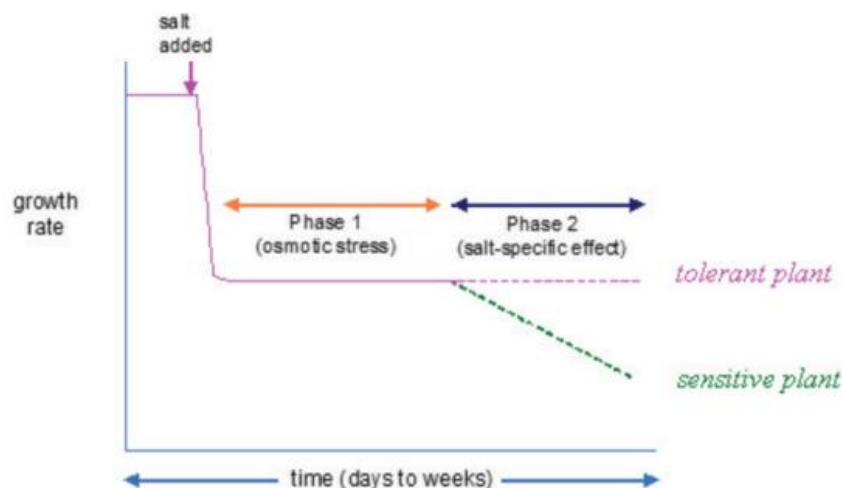
K významným abiotickým stresom patrí zasolenie pôdy. Soli sú bežnou a nevyhnutnou zložkou pôdy a rovnako sú i dôležitými živinami pre rastlinu. Hladiny solí v pôde však v skutočnosti sezónne a priestorovo kolíšu a zasolenie je najzávažnejšou hrozbou pre poľnohospodárstvo a životné prostredie v mnohých častiach sveta (Carillo *et al.*, 2011).

Zasolenie pôdy vedie ku zníženiu rastu rastlín, vývoja a možnosti prežitia. Stres zo zasolenia je opísaný dvojfázovým modelom, ktorý opisuje osmotické a iónové účinky. Prvá osmotická fáza začína bezprostredne po zvýšení koncentrácie soli v prostredí v okolí koreňa, dochádza k narušeniu schopnosti koreňa extrahovať vodu a okamžitou reakciou na tento účinok je uzavretie prieduchov z dôvodu rozdielneho vodného potenciálu medzi atmosférou a listovými bunkami. Viditeľnou reakciou rastliny na zvýšenie koncentrácie soli v jej prostredí, kedy staré listy odumierajú a znižujú fotosyntetickú kapacitu rastliny. pre ióny a pre ich akumuláciu (najmä Na^+ iónov) vo fotosyntetických tkanivách, dochádza k ovplyvneniu enzýmov, chlorofylu a karotenoidov. Následne dochádza k zníženiu rýchlosti fotosyntézy a ku zvýšeniu produkcie reaktívnych kyslíkových foriem (ROS) (Carillo *et al.*, 2011).

Reaktívne kyslíkové formy (ROS) a reaktívne dusíkové formy (RNS) sú prvými signálmi rastliny v reakcii na abiotické stresy, ktoré modifikujú enzýmovú aktivitu a génovú reguláciu. ROS a RNS tvoria koordinovanú sieť, ktorá reguluje mnohé reakcie rastlín na životné prostredie (Cramer *et al.*, 2011).

Podľa Obr. 8 môžeme skrátene napísať, že ak je rastlina vystavená nadmernému zasoleniu dochádza k iónovej toxicite v bunke, nasleduje prerušenie osmotickej rovnováhy, keď je stres predĺžený na dlhšiu dobu. Kombinovaný účinok týchto iónových aj osmotických šokov vedie k potlačeniu rastu a vývoja rastliny. Rastlina je schopná tolerovať zasolenie prostredia do určitej miery a to upravovaním osmotickej a iónovej rovnováhy v bunkách. Rastliny sa zvyčajne snažia vyhnúť prostrediu s vysokým obsahom solí tým, že udržiavajú

citlivé rastlinné tkanivá mimo zóny vysokej slanosti alebo vylučujú ióny z koreňov alebo ich rozdeľujú od cytoplazmy fyziologicky aktívnych buniek (Meena *et al.*, 2017).



Obr. č. 8: Schéma reakcie rastu rastliny na zasolenie. Prevzaté od Munns *et al.*, 1995

Tolerancia soli je schopnosť rastlín rásť a dokončiť svoj životný cyklus v prostredí s vysokou koncentráciou soli. Rastliny, ktoré môžu prežiť pri vysokej koncentrácii soli sa nazývajú halofyty. Rastliny počas svojho biologického vývinu vytvorili množstvo biochemických a molekulárnych mechanizmov na zvládnutie stresu zo zasolenia. Biochemické stratégie zahŕňajú: selektívnu akumuláciu alebo vylúčenie iónov, kontrolu príjmu iónov koreňom a transport do listov, kompartmentáciu, teda rozdelenie iónov na úrovni buniek a rastlín, syntézu kompatibilných rozpustených látok, zmenu vo fotosyntetickej ceste, zmenu v membránovej štruktúre, indukciu antioxidantných enzýmov a indukcia rastlinných hormónov (Parida and Das, 2005).

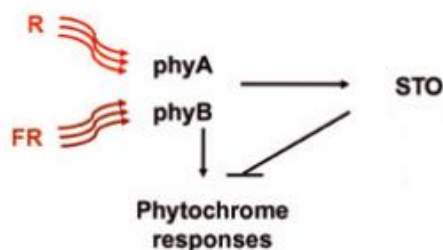
2.3 Vplyv svetla na schopnosť rastlín tolerovať stres vyvolaný zasolením

Fotoreceptory obsiahnuté v rastlinách snímajú zmeny svetelného spektra a aklimatizujú sa na rôzne okolité podmienky. Fotoreceptory sú teda tiež súčasťou reakcií vyvolaných stresom (D'Amico-Damião *et al.*, 2018).

Práce ukázali, že keď sú rastliny vystavené zmenám v pomere červeného a dlhovlnového červeného svetla (R/FR), dochádza k výrazným biochemickým zmenám v reakcii sprostredkovanej fytochrómami na stres zo zasolenia. Bolo dokázané, že svetlo s nízkym pomerom R/FR, na rozdiel od svetla s vysokým pomerom R/FR, spôsobilo indukciu tvorby pinitolu, rozpustného uhľohydrátu, ktorý sa hromadí v mnohých druhoch rastlín počas stresu (Carvalho *et al.*, 2011). A nie len to, u sadenice paradajok bolo zistené, že

v podmienkach s vyššou koncentráciou soli a pri nižšej hodnote R/FR svetla, došlo k zvýšeniu rastu, obsahu prolínu a obsahu chlorofylu, zatiaľ čo sa znížil obsah malondialdehydu. Počas zasolenia spôsobila nižšia hodnota R/FR pokles tvorby superoxidového aniónu a peroxidu vodíka, zvýšenie aktivity superoxidázovej dizutázy, peroxidázy a katalázy. Sadenice paradajok pestované pri nižšej hodnote R/FR a pri podmienkach slanosti vykazovali vyšší kvantový výťažok fotosyntézy, vyššiu rýchlosť transportu elektrónov. Tolerancia slanosti indukovaná pri podmienkach nižšieho R/FR však zmizla v mutante paradajky deficitnom vo fytochróme B1 (phyB1). Tieto výsledky naznačujú, že pestovanie paradajok s nižšou hodnotou R/FR by mohlo zlepšiť toleranciu k zasoleniu sadeníc a phyB1 hrá v tomto procese veľmi dôležitú úlohu (Cao *et al.*, 2018).

Expresia génov SALT TOLERANCE (STO) je pod kontrolou R a FR svetla v závislosti od fytochrómu A (phyA) a fytochrómu B (phyB). Proteín tolerancie voči zasoleniu (STO) u *Arabidopsis* bol identifikovaný ako proteín poskytujúci kvasinkovým bunkám toleranciu voči zasoleniu. Transkripčná analýza STO odhalila reguláciu génovej expresie závislú i od cirkadiánnych hodín (Indorf *et al.*, 2007).



Obr. č. 9: Expresia génu SALT TOLERANCE (STO). Prevzaté a upravené od Carvalho *et al.*, 2011.

Fytochróm interagujúci faktor 3 (*PIF3*) aktivuje gény transkripčnej siete, ktoré reagujú na svetlo v koordinácii s cirkadiánnymi hodinami a rastlinnými hormónmi rastu. *ZmPIF3* kóduje kukuričný *PIF3* proteín a je silne exprimovaný v listoch. Táto expresia reaguje na stres vyvolaný zasolením. Avšak transgénne rastliny *ZmPIF3* boli tolerantnejšie voči dehydratácií a stresu zo zasolenia. No mali zvýšený relatívny obsah vody a obsah chlorofylu ako aj významne zvýšenú stabilitu bunkovej membrány za stresových podmienok. Nadmerná expresia *ZmPIF3* zvýšila expresiu génov reagujúcich na stres. Zistenia tiež naznačujú, že *ZmPIF3* reguluje reakciu rastlín na sucho a soľ. V posledných niekoľkých rokoch sa preukázalo, že členovia rodiny PIF sa podieľajú aj na biosyntéze a signalizácií

hormónov ako je gibberellín (GA), kyselina abscisová (ABA), brassinosteroidy a auxín (IAA) (Gao *et al.*, 2015)

Hem oxygenáza (HO), ktorá hrá hlavnú úlohu vo syntéze fytochrómového chromoforu, bola spojená so stresom rastlín a najmä so stresom zo zasolenia. Bolo preukázané, že dráhy signálnej transdukcie zapojené do oxidačného stresu vyvolaného stresom zo zasolenia boli podobné tým, ktoré sa podieľajú na indukcii HO (Carvalho *et al.*, 2011).

Dôležitú úlohu v reakcií rastlín k abiotickým stresom zohráva i modré svetlo. U paradajky bolo zistené, že modré svetlo výrazne zosilňuje citlivosť klíčenia semien a hypokotylov k osmotickému stresu (Fellner and Sawhney 2002). Neskôr bolo zistené, že modré svetlo ovplyvňuje tieto reakcie k osmotickému stresu pravdepodobne prostredníctvom fototropínových signálnych dráh (Fellner 2018). Podobné výsledky boli pozorované i u klíčenia semien *Arabidopsis* (Fellner 2018).

Modré svetlo tak isto ovplyvňuje toleranciu semien paradajky a *Arabidopsis* k zasoleniu. Zatiaľ čo tolerancia klíčenia semien paradajky k prítomnosti NaCl je zoslabovaná modrým svetlom, a to prostredníctvom fotoreceptoru Cry1a, u *Arabidopsis* je tolerancia k zasoleniu modrým svetlom zvyšovaná, a to prostredníctvom fotoreceptoru Cry1 a Cry2 (Fellner 2018).

Úloha modrého svetla a kryptochrómov v tolerancií k rôznym abiotickým stresom bola potvrdená i inými autormi. Bolo vypozerované, že transgénne línie *Arabidopsis*, ktoré nadmerne exprimujú fotoreceptory TaCRY1a a TaCRY2 z *T. aestivum*, mali v porovnaní s kontrolnou vzorkou silnejšiu citlivosťou k zasoleniu. Zároveň však rastliny overexprimujúce TaCRY1a boli citlivejšie k zasoleniu ako rastliny overexprimujúce TaCRY2. Ukázalo sa, že kryptochrómy (CRY) regulujú reakcie na stres v slanom stave signalizačnými dráhami závislými od kyseliny abscicovej (ABA). Fenotypy rastlín *Arabidopsis* nevykazovali žiadne zjavné morfológické rozdiely v porovnaní s kultivarom, keď boli pestované 4 dni v tme. Mali ale porovnateľne kratšie hypokotyly s výraznejšou farbou, keď boli pestované 4 dni na modrom svetle. Je zrejmé, že tieto výsledky umožňujú vedcom poskytnúť viac dôkazov o tom, ako transdukcia signálov kryptochrómov ovplyvňuje aklimatizáciu rastlín k zasolenému prostrediu (Xu *et al.*, 2009).

Aktivácia CRY1 *Arabidopsis* modrým svetlom viedla tiež k priamej enzymatickej premene molekulárneho kyslíka na reaktívne druhy kyslíka (ROS) a peroxidu vodíka *in vitro*.

Tvorba ROS, ktorá je výsledkom expície CRY1, môže tak viesť až ku bunkovej smrti (Consentino *et al.*, 2015).

Do reakcií na soľný stres je zapojených aj niekoľko ďalších fotoreceptorov a signálnych zložiek a regulátorov transkripcie. Medzi fotoreceptory patria už vyššie spomenuté fototropíny a ďalej proteínová kináza, MCamb1 a MCamb2, proteín podobný 14-3-3 a PpDBF1. U machorastov i vyšších rastlín môžu fototropíny a proteíny 14-3-3 spolupracovať pri regulácii H⁺-ATPázy plazmatickej membrány a udržiavaní homeostázy iónov, pretože hrajú úlohu primárnych signalizačných proteínov (Wang *et al.* 2008). Tieto signály sú rozpoznané plazmatickou membránou a prenášané vo vnútri cytoplazmy, kde dochádza ku prechodnému zvýšeniu hladiny Ca²⁺, ktorý zohráva úlohu sekundárneho posla pri reakcií rastliny k abiotickému stresu. Záverom dochádza ku aktivácii mitogénom aktivovanej proteínkinázy, ktorá reguluje génovú expíciu fosforyláciou mnohých transkripčných aktivátorov (Ćosić *et al.* 2018).

Jedným z hlavných obranných mechanizmov rastlín k zasoleniu signalizačná dráha zapojujúca proteíny skupiny Salt Overly Sensitive (SOS) dráha, ktorá je vyvolaná signálom Ca²⁺ generovaným soľným stresom. Soľný stres indukuje alebo zvyšuje proteazomálnu degradáciu proteínu GIGANTEA (GI), ktorý stabilizuje proteín F-box fotoreceptorov rodiny ZEITLUPE (ZTL) a udržiava cirkadiánne hodiny rastlín. Následne uvoľňuje proteínovú kinázu SOS2, ktorou GI interaguje a ktorá je známym kľúčovým prvkom dráhy SOS. Táto interakcia silne redukuje alebo zabraňuje funkcií SOS2, čo je aktivácia anti-SOS1 s transportnou aktivitou za normálnych podmienok. Zabránenie vo funkcií SOS2 má za následok zmenu fenotypu rastliny, ktorá bude k stresu zo zasolenia vysoko citlivá (Park *et al.* 2016).

Je si potrebné na záver pripomenúť, že okrem svetelných signálov vnímaných fytochrómami a kryptochrómami, vyžaduje reakcia na stres signalizačnú sieť zahŕňajúcu aj informácie od ostatných fotoreceptorov a interakcie so širokým spektrom molekúl. Fotoreceptory modulujú odpoveď rastlín na biotický aj abiotický stres, čo následne vedie k sérii ďalších štúdií skúmajúcich molekulárnu a biochemickú bázu procesov zapojených v citlivosti či tolerancii rastlín k stresom (Carvalho *et al.* 2011).

3 Materiál a metodika

3.1 Rastlinný materiál

Experimenty boli vykonávané na modelovej rastline paradajky jedlej *Solanum lycopersicum* L. s využitím recesívnych mutantov s defektom v jednom géne. Konkrétne boli použité mutanty: *tri1* (*temporarily red light-insensitive 1*) odvodený od kultivaru cv. GT, ktorý je deficientný v phyB1 (Van Tuinen *et al.*, 1995); *fri1* (*far-red-insensitive 1*) odvodený od kultivaru cv. Money Maker (cv. MM) (Kerckhoffs *et al.*, 1997), ktorý je deficientný vo phyA a mutant *au^w* (*aurea*) odvodený od kultivaru cv. Money Maker (cv. MM, LA 2706) (Koornneef *et al.*, 1985), ktorý je deficientný vo fytochrómovom chromofóre.

3.2 Príprava média

K príprave 2 l kultivačného média Murashige- Skoog (MS) (Murashige and Skoog, 1962) bolo použitých 20 g sacharózy, 8,66 g MS média (Cat. no. M5524, Caisson, USA), 0,3904 g MES pufru (2-(N-morpholino) ethanesulfonic acid, cat. no. 29834.02, Serva, Nemecko). Do Erlenmeyerovej banky bolo v 1 l destilovanej vody postupne rozpustené dané množstvo sacharózy, MS média a MES pufru. Po premiešaní bol objem doplnený na 2 l a pH bolo pomocou 1M roztoku KOH upravené na hodnotu 6,1. Táto hodnota sa počas autoklárovania znížila na požadovanú hodnotu 5,7, vhodnú pre rastliny. Médium bolo rozdelené po 400 ml do piatich vopred pripravených termofľaš o objeme 500 ml, pričom do každej z nich bolo predtým nasýpaných 2,8 g. Takto pripravené médium bolo sterilizované v autokláve a po vychladnutí boli termofľaše s médiom uchované v chladničke.

3.3 Výsev semien

Sterilizácia semien a ich následný výsev bol prevádzaný vo flow-boxe (Holten Horizontal Laminar 16 Airflow Clean Bench, Thermo Scientific) za sterilných podmienok. Požadovaný počet semien z každého genotypu bol povrchovo sterilizovaný v plastových skúmavkách Falcon o objeme 50 ml po dobu 30 minút v zriedenom roztoku NaClO s 2,8% aktívneho chlóru (0,6 l SAVO + 0,4 l dH₂O). Obsah skúmavky bol pár krát pretrepaný, pre väčšiu účinnosť sterilizácie. Následne boli semená pomocou 10 ml pipety 7 krát premyté sterilnou destilovanou vodou. Semená boli vysiate vždy po 50 na jednu plastovú sterilnú okrúhlu Petriho misku (priemer 90mm). Do misiek bolo naliate kultivačné médium (20 ml/misku). Kultivačné médium bolo zohriate pomocou mikrovlnnej rúry. Výsev semien bol prevádzaný pomocou pinzety sterilizovanej v 96% ethanole a ožehnutej nad plameňom. Po výseve boli misky oblepené dookola dvoma vrstvami pásky SoftPore (Batist s.r.o.) z netkanej textílie.

Nakoniec boli misky vertikálne zabalené do alobalu, tak aby nedošlo k prístupu svetla, teda aby došlo ku simulácii tmy. Misky boli následne vložené do rastovej automatickej kultivačnej rastovej komory (Microclima 1000E, Snijders Scientific, Holandsko) a semená boli kultivované pri stálej teplote 23°C po dobu štyroch dní.

3.4 Prenos klíčkov

Prenesenie klíčiacych semien z misiek, kde po dobu štyroch dní v simulovanej tme klíčili, bol prevádzaný za sterilných podmienok vo flow-buxe (Holten Horizontal Laminar 16 Airflow Clean Bench, Thermo Scientific). Bol pripravený daný počet okrúhlych Petriho misiek (priemer 90 mm), kde bolo naliate kultivačné médium (20 ml/misku) obohatené o rôzne koncentrácie NaCl. Pre experimenty boli zvolené koncentrácie NaCl 0, 100, 150, 200 mmol/l.

Tab. č. 1: Množstvo NaCl, pridanej do 120 ml média, podľa danej koncentrácie

Požadovaná koncentrácia (mM)	Množstvo 5M NaCl (ml)
100	2,4
150	3,6
200	4,8

Následne boli vyklíčené semená pomocou pinzety sterilizovanej v 96% ethanole a ožehnutej nad plameňom prenesené na pripravené misky s médium o danej koncentrácií. Semená boli vyberané náhodne a zoradené do radu uprostred misky po 5 až 8 exemplárov so vzrastajúcou sa veľkosťou klíčka. Misky boli oblepené dvoma vrstvami pásky SoftPore (Batist s.r.o.) z netkanej textílie, aby nedošlo k prípadnej kontaminácii. Nato boli misky rozdelené a umiestnené vo vertikálnej pozícii do plastových stojanov, ktoré boli umiestnené do automatickej kultivačnej rastovej komory (Microclima 1000E, Snijders Scientific, Nizozemsko), na kontinuálne modré a červené svetlo. Zdrojom modrého svetla s maximálnou žiarivosťou 10 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ pri 440 nm bola žiarovka Philips TLD-36W/18-Blue a zdrojom červeného svetla s maximálnou žiarivosťou 10 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ pri 660 nm bola žiarovka Philips TLD36W/15-Red. Misky so semenami určenými pre kultiváciu v tme boli zabalené do alobalu, aby nedošlo k prístupu svetla, a následne boli umiestnené do jednej z komôr. Semená boli kultivované pri teplote 23°C po dobu 7 dní. Na záver boli rastliny vyklíčené v miskách o danej koncentrácií zmerané a to pomocou pravítka s presnosťou na 1 mm, kedy bola meraná dĺžka koreňa a hypokotylu a bol sledovaný celkový fenotyp rastlín.

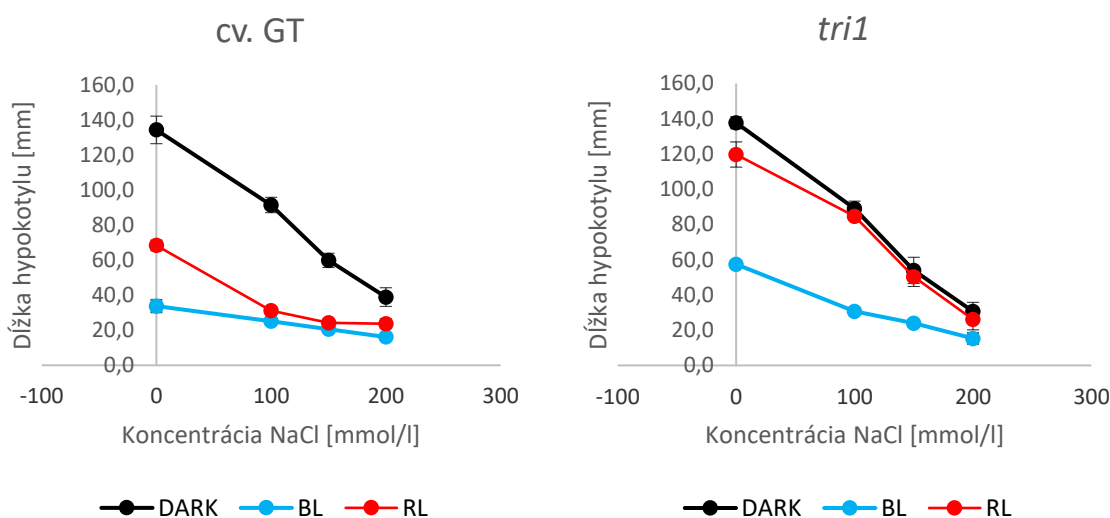
Každý experiment bol opakovaný 4 krát a z nameraných výsledkov bol vypočítaný priemer pre každú miskú. Výsledky boli následne prezentované graficky.

4 Výsledky

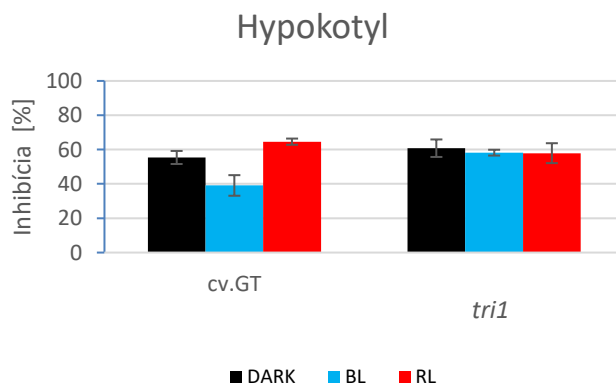
Účelom práce bolo zistiť aký má svetlo vplyv na rast rastlín paradajky jedlej (*S. lycopersicum*), vystavených soľnému stresu, teda zistiť vplyv svetla na schopnosť rastlín tolerovať stres zo zasolenia. Druhým cieľom práce bolo zistiť, či je vplyv svetla na toleranciu rastlín k zasoleniu sprostredkovaný fotoreceptory fytochrómami. Pre tento účel boli využité rastlinné mutanty s defektami vo fytochrómoch, ktoré boli odvodené od odpovedajúcich kultivarov (viď kapitola 3.1). Bol sledovaný rast rastlín v podmienkach tmy (D), modrého svetla (BL) a červeného svetla (RL) v závislosti na koncentrácií NaCl v médiu. Po 7 dňoch rastu boli zozbierané výsledky, ktoré sa týkali dĺžky koreňa a dĺžky hypokotylu a bola vypočítaná inhibícia rastu.

4.1 Rastové reakcie mutanta *tri1*

Klíčky paradajky jedlej (*S. lycopersicum*) boli kultivované na kultivačnom MS médiu s koncentráciou NaCl 0, 100, 150 a 200 mmol/l. Podľa Obr. 10 je možné sledovať, že hypokotyly rastlín kultivaru cv. GT boli najkratšie pri raste na modrom svetle a najdlhšie v tme. So vzrastajúcou koncentráciou NaCl v médiu bol rast hypokotyly cv. GT silno inhibovaný. Vypočítané hodnoty inhibície ukazujú, že na modrom svetle bola inhibícia rastu hypokotyly cv. GT pri koncentracii NaCl 150 mmol/l najmenšie (asi 40%), kdežto najväčšia bola na červenom svetle (65%) (Obr. 11). Podobne tomu bolo aj u ďalších testovaných koncentráciách NaCl.



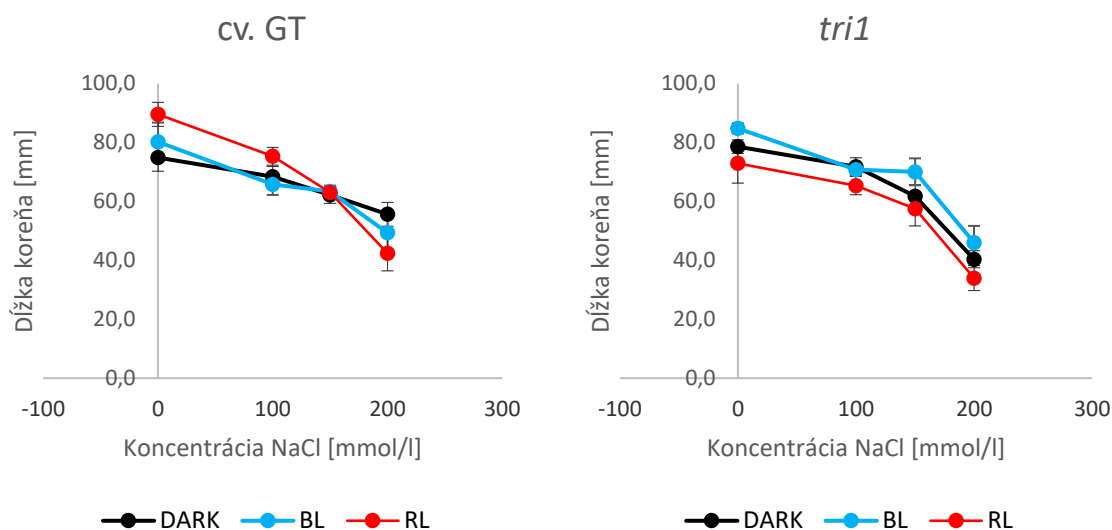
Obr. č. 10: Vplyv NaCl na rast hypokotyl paradajky jedlej (*S. lycopersicum*) cv. GT a mutanta *tri1* v tme (DARK), na modrom svetle (BL) a na červenom svetle (RL) v 7 deň prenosu klíčkov na MS médiu s danou koncentráciou NaCl. Výsledky predstavujú priemerné hodnoty dĺžok hypokotyl ± SE vypočítaných z 6 (DARK) alebo 4 (BL, RL) nezávislých experimentov.



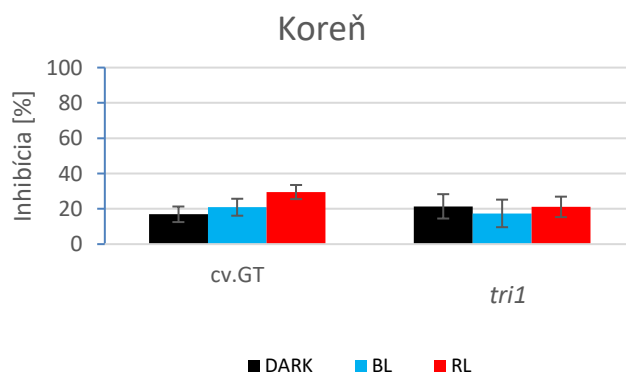
Obr. č. 11: Porovnanie inhibícií hypokotyl kultivaru cv. GT a mutanta *tri1* pri koncentracii NaCl v MS médiu 150 mmol/l. Výsledky predstavujú priemerné hodnoty inhibície rastu hypokotyl ± SE vypočítaných z 6 (D) alebo 4 (BL, RL) nezávislých experimentov.

Na médiu bez prídavku NaCl vytváral mutant *tri1* na modrom svetle, ale predovšetkým na červenom svetle dlhší hypokotyl než cv. GT (Obr. 10). Prídavok NaCl do média potom spôsobil inhibíciu rastu hypokotylu. V porovnaní s cv. GT však bola inhibícia predlžovania hypokotylu mutantu *tri1* podobná v tme a červenom svetle (Obr. 11). Súčasne bolo z vypočítaných hodnôt zrejmé, že inhibícia rastu hypokotylu u mutantu *tri1* bola na modrom svetle výrazne vyššia než u cv. GT (Obr. 11)

Na Obr. 12 možné vidieť, že u cv GT modré, ale predovšetkým červené svetlo stimulovalo rast koreňa, zatiaľ čo u mutantu *tri1* k takejto stimulácii dochádzalo len na modrom svetle.



Obr. č. 12: Vplyv NaCl na rast koreňa paradajky jedlej (*S. lycopersicum*) cv. GT a mutantu *tri1* v tme (DARK), na modrom svetle (BL) a na červenom svetle (RL) v 7 deň prenosu klíčkov na MS médiu s danou koncentráciou NaCl. Výsledky predstavujú priemerné hodnoty dĺžok koreňov \pm SE vypočítaných z 6 (DARK) alebo 4 (BL, RL) nezávislých experimentov.

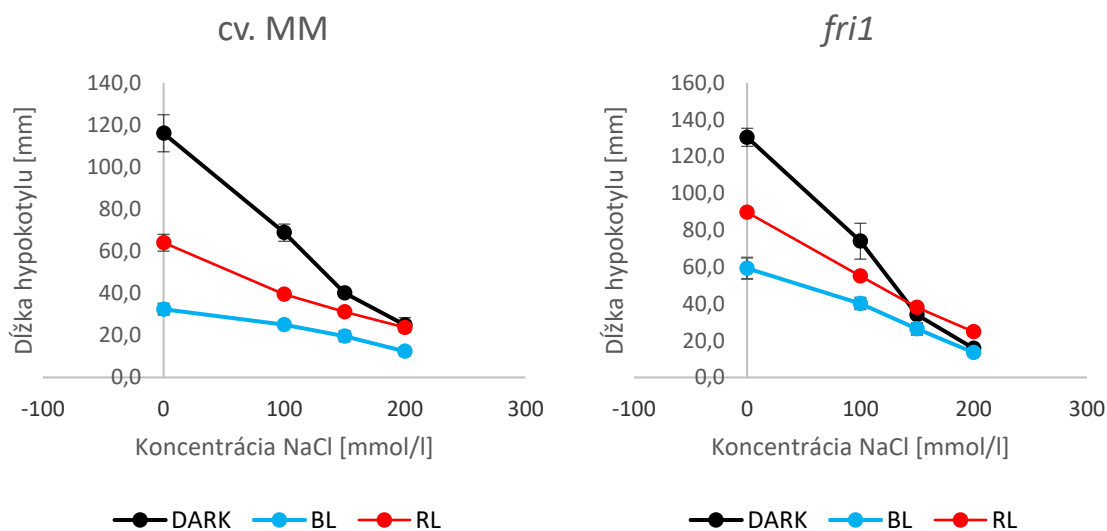


Obr. č. 13: Porovnanie inhibícií koreňov kultivaru cv. GT a mutantu *tri1* pri koncentracii NaCl v MS médiu 150 mmol/l v tme (DARK), na modrom svetle (BL) a na červenom svetle (RL) v 7 deň prenosu. Výsledky predstavujú priemerné hodnoty inhibície rastu koreňov \pm SE vypočítaných z 6 (DARK) alebo 4 (BL, RL) nezávislých experimentov.

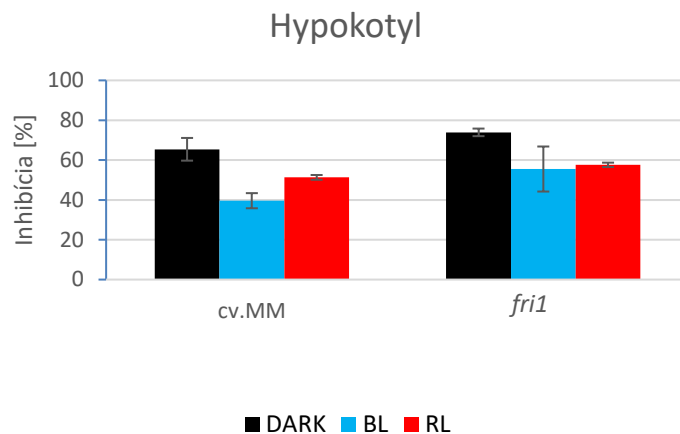
Podobne ako u hypokotyly bol rast koreňa u oboch genotypoch inhibovaný chloridom sódnym úmerne so zvyšujúcou sa koncentráciou soli (Obr. 12). Vypočítaná inhibícia rastu koreňa cv. GT na 150 mM koncentrácií NaCl bola na červenom svetle vyššia než v tme (Obr. 13). Podobne tomu bolo i u ďalších testovaných koncentráciách. Ďalej bolo pozorované, že u mutanta *tri1* bola inhibícia rastu hypokotyly vplyvom 150 mmol/l NaCl podobná v tme, na modrom i červenom svetle (Obr. 13). Súčasne bolo zistené, že pri koncentrácií 200 mmol/l boli v tme korene mutantu *tri1* výrazne kratšie, než u kultivaru cv. GT a teda menej tolerantné k zasoleniu než korene cv. GT (Obr. 12).

4.2 Rastové reakcie mutanta *fri1*

Na základe Obr. 14 je možné sledovať, že hypokotyly rastlín kultivaru cv. MM boli opäť najkratšie pri raste na modrom svetle a najdlhšie v tme. So vzrastajúcou koncentráciou NaCl v médiu bol rast hypokotyly kultivaru cv. MM silne inhibovaný. Hodnoty inhibície ukazujú, že na modrom svetle bola inhibícia rastu hypokotyly kultivaru cv. MM pri koncentrácií 150 mmol/l najmenšia (asi 40%) a najväčšia bola v tme (asi 65%) (Obr. 15). Podobne tomu bolo i u ďalších testovaných koncentráciách NaCl.



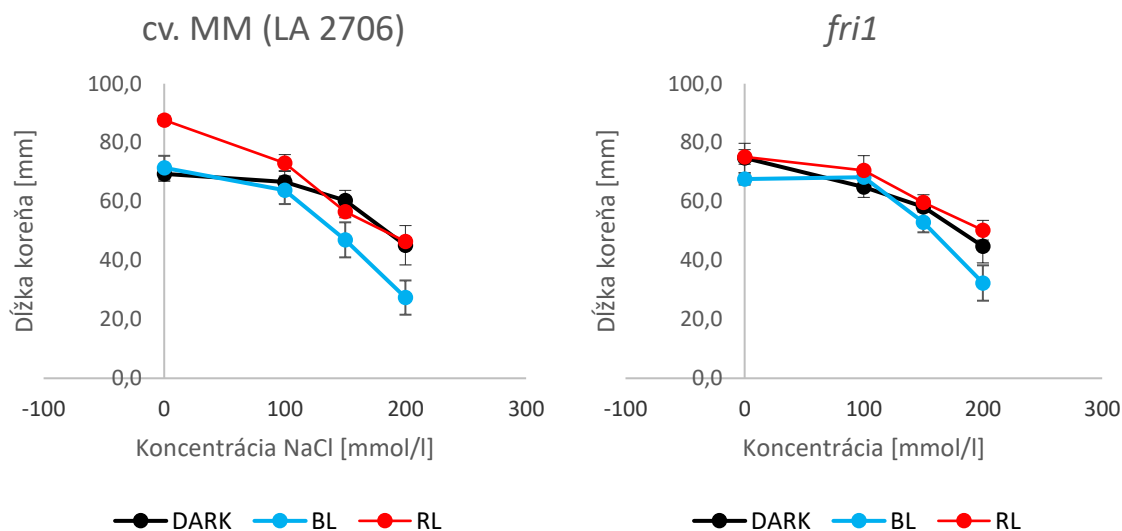
Obr. č. 14: Vplyv NaCl na rast hypokotyly paradajky jedlej (*S. lycopersicum*) cv. MM a mutanta *fri1* v tme (DARK), na modrom svetle (BL) a na červenom svetle (RL) v 7 deň prenosu klíčkov na MS médium s danou koncentráciou NaCl. Výsledky predstavujú priemerné hodnoty dĺžok hypokotylov \pm SE vypočítaných z 7 (DARK) alebo 4 (BL, RL) nezávislých experimentov.



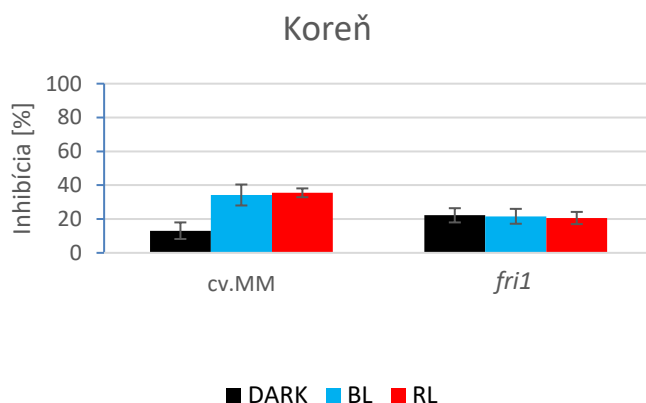
Obr. č. 15: Porovnanie inhibícií hypokotýlov kultivaru cv. MM a mutantu *fri1* pri koncentracii NaCl v MS médiu 150 mmol/l v tme (DARK), na modrom svetle (BL) a na červenom svetle (RL) v 7 deň prenosu. Výsledky predstavujú priemerné hodnoty inhibície rastu hypokotýlov \pm SE vypočítaných z 7 (DARK) alebo 4 (BL, RL) nezávislých experimentov.

Mutant *fri1* vytváral na modrom, ale i na červenom svetle viditeľne dlhší hypokotyl než kultivar cv. MM (Obr. 14) a prídanie NaCl do média rovnako spôsobovalo inhibíciu rastu hypokotýlu. V porovnaní s kultivarom cv. MM však bola inhibícia predĺžovania hypokotýlu mutantu *fri1* mierne vyššia v tme, na modrom svetle sa javila tiež vyššia, no na červenom svetle bola podobná (Obr. 15). Zároveň bolo pozorované, že inhibícia rastu hypokotýlu u mutantu *fri1* bola na modrom i červenom svetle výrazne nižšia než u kultivaru cv.MM (Obr. 15).

Na Obr. 16 je možné sledovať, že u kultivaru cv. MM predovšetkým červené svetlo stimulovalo rast koreňa, no u mutantu *fri1* k takejto stimulácii nedochádzalo.



Obr. č. 16: Vplyv NaCl na rast koreňa paradajky jedlej (*S. lycopersicum*) cv. MM a mutanta *fri1* v tme (DARK), na modrom svetle (BL) a na červenom svetle (RL) v 7 deň prenosu klíčkov na MS médiu s danou koncentráciou NaCl. Výsledky predstavujú priemerné hodnoty dĺžok koreňov \pm SE vypočítaných z 7 (DARK) alebo 4 (BL, RL) nezávislých experimentov.

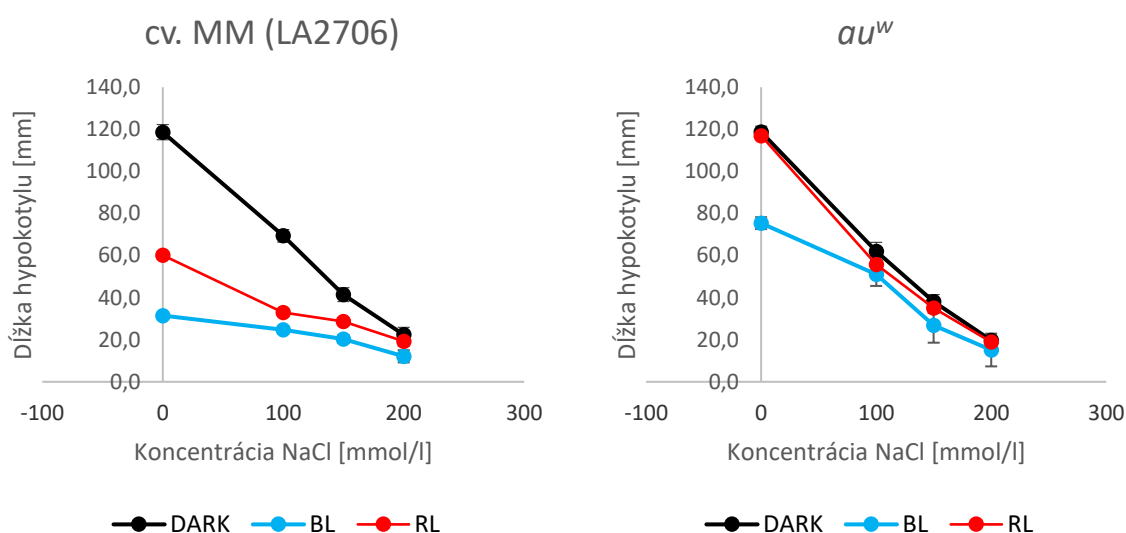


Obr. č. 17: Porovnanie inhibícií koreňov kultivaru cv. MM a mutanta *fri1* pri koncentracii NaCl v MS médiu 150 mmol/l v tme (DARK), na modrom svetle (BL) a na červenom svetle (RL) v 7 deň prenosu klíčkov na MS médiu s danou koncentráciou NaCl. Výsledky predstavujú priemerné hodnoty inhibície rastu koreňov \pm SE vypočítaných z 7 (DARK) alebo 4 (BL, RL) nezávislých experimentov.

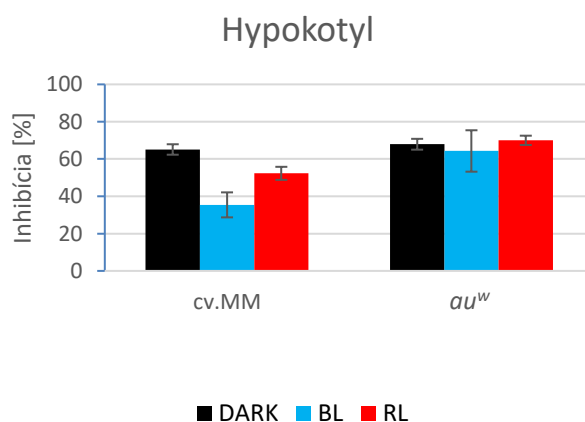
Podobne ako u hypokotylu, rovnako bol i rast koreňa u oboch genotypoch inhibovaný zvyšujúcou sa koncentráciou NaCl. Hodnoty inhibície rastu koreňa cv. MM na 150 mM koncentracii NaCl bola na červenom i modrom svetle výrazne vyššia než v tme (Obr. 17). Podobne tomu bolo i u ďalších testovaných koncentraciách. Ďalej bolo pozorované, že u mutanta *fri1* bola inhibícia rastu koreňa vplyvom 150 mmol/l NaCl podobná v tme, na modrom a i na červenom svetle (Obr. 17). Súčasne je možné pozorovať, že korene mutanta *fri1* ukazujú na modrom a červenom svetle nižšiu inhibíciu rastu pri zasolení (150 mmol/l) než korene cv. MM, čo platilo u všetkých použitých koncentraciách NaCl.

4.3 Rastové reakcie mutantu *au^w*

Klíčky paradajky jedlej (*S. lycopersicum*) boli kultivované na kultivačnom MS médiu, ktoré obsahovalo 0, 100, 150 a 200 mmol/l NaCl. Podľa Obr. 18 je možné pozorovať, že hypokotyly rastlín kultivaru cv. MM (LA2706) boli najkratšie pri kultivácii na modrom svetle a najdlhšie v tme. So vzrastajúcou koncentráciou NaCl v médiu bol rast hypokotyly cv. MM (LA2706) silno inhibovaný. Hodnoty inhibície ukazujú, že na modrom svetle bola inhibícia rastu hypokotyly cv. MM (LA2706) pri koncentracii NaCl 150 mmol/l najmenšia (asi 35%), na opačnej strane, najväčšia v tme (asi 60%) (Obr. 19) Podobne tomu bolo i u ďalších testovaných koncentráciách..



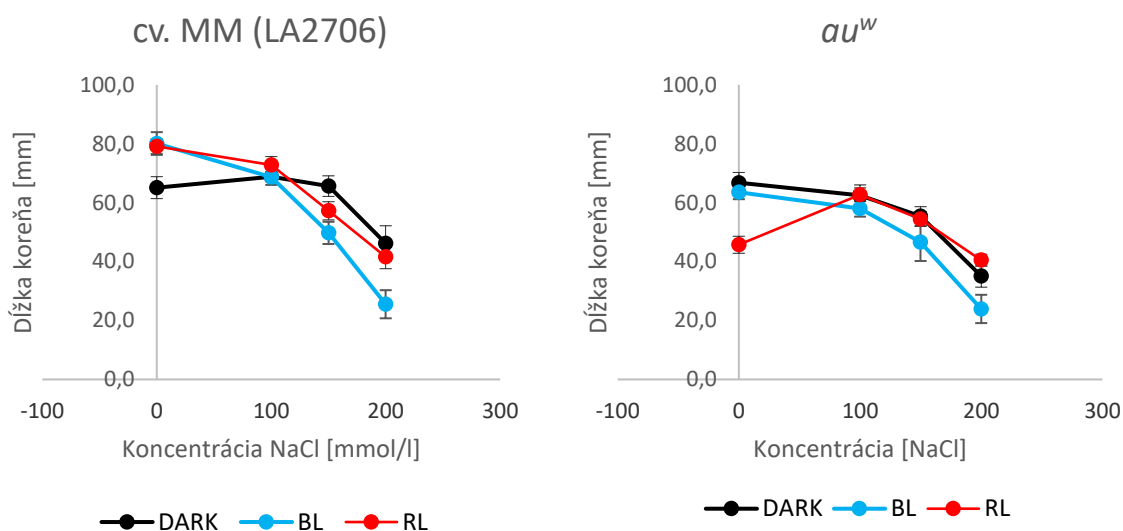
Obr. č. 18: Vplyv NaCl na rast hypokotyly paradajky jedlej (*S. lycopersicum*) cv. MM (LA2706) a mutantu *au^w* v tme (DARK), na modrom svetle (BL) a na červenom svetle (RL) v 7 deň prenosu klíčkov na MS médiu s danou koncentráciou NaCl. Výsledky predstavujú priemerné hodnoty dĺžok hypokotylov \pm SE vypočítaných z 7 (DARK) alebo 4 (BL, RL) nezávislých experimentov.



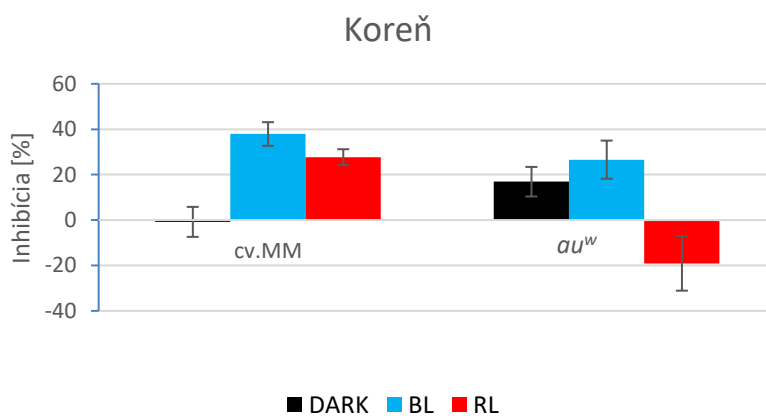
Obr. č. 19: Porovnanie inhibícií kultivaru cv. MM (LA2706) a mutantu *au^w* pri koncentracii NaCl v MS médiu 150 mmol/l v tme (DARK), na modrom svetle (BL) a na červenom svetle (RL) v 7 deň prenosu. Výsledky predstavujú priemerné hodnoty inhibície rastu hypokotylov \pm SE vypočítaných z 7 (DARK) alebo 4 (BL, RL) nezávislých experimentov.

Mutant au^w vytváral na modrom svetle a červenom svetle výrazné dlhšie hypokotyl než cv. MM (LA2706) (Obr. 18). Podobne ako u cv. MM (LA2706), NaCl pridaný do média redukoval výrazne rast hypokotyllov v tme, na modrom i červenom svetle (Obr. 18). Na modrom a červenom svetle však bola inhibícia rastu hypokotyllov u mutantu au^w v porovnaní s cv. MM (LA2706) výrazne vyššia (Obr. 19) pri koncentracii 150 mmol/l. Podobná situácia bola pozorovaná pri všetkých testovaných koncentraciách NaCl.

Na Obr. 20 je možné vidieť, že u cv. MM (LA2706) modré a červené svetlo pri absencii NaCl stimulovalo rast koreňa, zatiaľ čo u mutantu au^w ku takejto stimulácii nedochádzalo.



Obr. č. 20: Vplyv NaCl na rast koreňa paradajky jedlej (*S. lycopersicum*) cv. MM (LA2706) a mutantu au^w v tme (DARK), na modrom svetle (BL) a na červenom svetle (RL) v 7 deň prenosu klíčkov na MS médium s danou koncentraciou NaCl. Výsledky predstavujú priemerné hodnoty dĺžok koreňov \pm SE vypočítaných z 7 (DARK) alebo 4 (BL, RL) nezávislých experimentov.



Obr. č. 21: Porovnanie inhibícií kultivaru cv. MM (LA2706) a mutantu au^w pri koncentracii NaCl v MS médiu 150 mmol/l v tme (DARK), na modrom svetle (BL) a na červenom svetle (RL) v 7 deň prenosu. Výsledky predstavujú priemerné hodnoty inhibície rastu hypokotyllov \pm SE vypočítaných z 7 (DARK) alebo 4 (BL, RL) nezávislých experimentov.

U cv. MM (LA2706) bol rast koreňa inhibovaný prítomnosťou danej koncentrácie NaCl v kultivačnom médiu (Obr. 20). U mutanta *au^w* bol rast koreňov inhibovaný NaCl v tme a na modrom svetle, kdežto na červenom svetle dochádzalo pri koncentráciách 150 a 200 mmol/l NaCl k stimulácií rastu koreňa (Obr. 20). Inhibícia rastu koreňa kultivaru cv. MM (LA2706) na 150 mM koncentrácií NaCl bola na červenom i na modrom svetle výrazne vyššia než v tme (Obr. 21). Ďalej bolo pozorované, že v porovnaní s koreňmi cv. MM (LA2706) bola u mutanta *au^w* inhibícia rastu koreňa vplyvom 150 mmol/l NaCl v tme výrazne vyššia, kdežto na červenom svetle dochádzalo pri tejto koncentrácií ku stumulácií rastu koreňa (Obr. 21). Podobne znížená citlivosť koreňov mutanta *au^w* k NaCl na červenom svetle bola pozorovaná u všetkých testovaných koncentráciách NaCl.

5 Diskusia

Na snímanie kvality a množstva svetla majú rastliny rôzne skupiny fotoreceptorov. Fytochrómový fotoreceptorový systém, ktorý absorbuje červené a dlhovlnné červené svetlo, zohráva v živote rastlín dôležitú úlohu. Zasahuje do procesov ako sú klíčenie semien, inhibícia rastu hypokotylu, otvorenie apikálneho háčika, vývoj chloroplastov, vyhýbanie sa tieňom a indukciu kvitnutia (Van Tuinen *et al.*, 1995). Ďalšou úlohou fytochrómov vo vývoji rastlín je tiež modulácia reakcií na množstvo abiotických a biotických stresov, teda fytochrómy sú dôležitou súčasťou signálnych dráh rastlín. Na vyhodnotenie úlohy fytochrómov v stresovej reakcii sa používajú fotomorfogénne mutanty. Mutanty s deficitom fytochrómu sa ukázali ako veľmi užitočné k stanoveniu toho, či je fenotypová reakcia sprostredkovaná fytochrómom, na identifikáciu funkcie jednotlivých fytochrómov a na experimenty určené k rekonštitúcii transdukčných dráh signálu fytochrómov (Kendrick *et al.*, 1994)

Predmetom experimentálnej časti bakalárskej práce bolo štúdium zapojenia fytochrómovv regulácií stresových odpovedí rastlín *Solanum lycopersicum* L. na stres zasolením. Došlo ku analýze rastu mutantných klíčkov *tri1*, *fri1* a *au^w* a ich príslušných kultivarov GT a Money Maker v prostredí bez prístupu svetla, teda v tme, ďalej pod červeným a modrým svetlom. Klíčky boli kultivované na MS médiách o rôznej koncentrácii NaCl (0, 100, 150 a 200 mmol/l).

Analýza fotomorfogenných mutantov *tri1*, *fri1* a *au^w* potvrdila výrazný fenotyp hypokotylu na modrom a červenom svetle. Mutanti vytvárali výrazne dlhý hypokotyl, v porovnaní s hypokotylmi kontrolných genotypov, čo odpovedá literárnym údajom (Van Tuinen *et al.*, 1995). Súčasné predlžovanie hypokotylu všetkých testovaných mutantov bolo menej inhibované svetlom, než predlžovanie hypokotylu príslušných kultivarov. Je známe, že svetlo stimuluje rast koreňov. Táto stimulácia bola pozorovaná u koreňov všetkých použitých kultivarov cv. GT, cv. MM a cv. MM (LA2706) na modrom, ale predovšetkým na červenom svetle. Stimulácia svetlom však nebola pozorovaná alebo bola zanedbateľná u všetkých troch použitých mutantoch. Tieto výsledky opäť potvrdzujú, že *tri1*, *fri1* a *au^w* sú naozaj fotomorfogénne mutanty.

Experimenty vykonané v bakalárskej práci odhalili, že NaCl o koncentráciách 100 až 200 mmol/l výrazne inhibovala rast hypokotylu mutantu *tri1* i príslušného kultivaru cv. GT. U kultivaru cv. GT bolo pozorované, že inhibičný účinok NaCl je najsilnejší

u etiolizovaných rastlín a rastlín rastúcich na červenom svetle, zatiaľ čo na modrom svetle bol efekt NaCl slabší. Hypokotyly mutantu *tri1* však ukazovali rovnakú citlivosť k zasoleniu na modrom i červenom svetle ako v tme. Tieto výsledky vedú k záveru, že modré svetlo zvyšuje toleranciu hypokotyly paradajky k zasoleniu, a že sa tak deje prostredníctvom fotoreceptoru phyB1. Navyše bolo zistené, že pestovanie mutantu *tri1* na svetle o nízkom R/FR môže zlepšiť toleranciu k zasoleniu sadeníc a že phyB1 hrá v tomto procese veľmi dôležitú úlohu (Cao *et al.* (2018)). Vplyvom modrého svetla na toleranciu paradajky sme sa však nezaoberali.

Výsledky našich experimentov ďalej ukázali, že v podmienkach modrého i červeného svetla došlo ku zvýšeniu citlivosti koreňa kultivaru cv. GT k zasoleniu. Pretože u mutantu *tri1* tento účinok svetla pozorovaný nebol alebo bol o dosť slabší, je možné urobiť záver, že modré i červené svetlo zvyšujú citlivosť koreňa k NaCl prostredníctvom phyB1.

Predchádzajúce štúdiá zistili, že mutantné rastliny *fri1*, ktoré sú deficitné v prítomnosti phyA ukázali, že sú iba o niečo vyššie ako WT a sú fenotypovo podobné, čo dokazuje, že phyA hrá v rastlinách pestovaných na svetle malú úlohu (Terry, 1997). Rovnako i spektrofotometrická analýza ukázala, že skupina phyA je vyčerpaná po 4 hodinách R, phyB alebo iné fytochrómy stabilné proti svetlu musia hrať hlavnú úlohu pri inhibícii rastu pri nepretržitom R (Van Tuinen *et al.*, 1995)

Čo sa týka výsledkov experimentov s mutantom *fri1*, zistili sme, že rast hypokotylov odpovedajúceho kultivaru cv. MM bol inhibovaný NaCl na modrom a červenom svetle výrazne menej než v tme. Je teda možné vytvoriť záver, že modré a červené svetlo zvyšuje toleranciu hypokotyly paradajky k zasoleniu. U mutantu *fri1* bol tento účinok svetla pozorovaný rovnako, ale menej výrazný než u cv. MM. Je teda možné uvažovať o tom, že svetlo zvyšuje toleranciu hypokotylov k zasoleniu prostredníctvom fotoreceptoru phyA.

Korene cv. MM ukazovali značne zvýšenú citlivosť k NaCl na modrom svetle, a menej zreteľne i na červenom svetle. Naproti tomu, u mutantu *fri1* nebol tento trend evidentný. Je teda možné vytvoriť záver, že modré svetlo zvyšuje citlivosť kultivaru cv. MM k solnému stresu vďaka phyA.

Asi najznámejšou črtou mutantov s nedostatkom chromofóru je bledá žltá alebo žltozelená farba. Bunky mutantných rastlín majú znížený počet chloroplastov a znížené hladiny chlorofylu, čo má tiež vplyv na expresiu génov kódujúcich proteíny regulované fytochrómom. U niektorých druhov ako napríklad paradajok, k bledému fenotypu prispieva aj výrazné zníženie syntézy antokyanov (Kendrick *et al.*, 1997). Podobne ako u cv. GT a

u cv. MM, inhibičný vplyv NaCl na rast hypokotylu cv. MM (LA2706) bol nápadne znížený u rastlín rastúcich na modrom svetle. U mutanta *au^w* však k takémuto znižovaniu nedochádzalo - inhibícia rastu hypokotylu mutanta vplyvom NaCl bola podobná u rastlín rastúcich v tme a na modrom svetle. Výsledky teda naznačujú, že modré svetlo znižuje citlivosť hypokotylu paradajky k soľnému stresu a to vďaka chromofóru.

Čo sa týka koreňov u cv. MM (LA2706) bol vplyv zasolenia na svetle a predovšetkým na modrom o dosť silnejší než u koreňov rastlín rastúcich v tme. Opäť sa ukazuje, že svetlo zvyšuje citlivosť koreňov paradajky k zasoleniu. U mutanta bol tento účinok zjavný len na modrom svetle a to veľmi slabo, kdežto na červenom svetle bola citlivosť koreňov k NaCl ešte nižšia než v tme. Je možné teda tvrdiť, že modré a červené svetlo zvyšuje citlivosť koreňov kultivaru cv. MM (LA2706) k soľnému stresu prostredníctvom chromofóru.

6 Záver

Témou bakalárskej práce je štúdium interakcií signálnych dráh fytochrómov a abiotických stresov, konkrétne zasolenia. Experimentálnym cieľom bakalárskej práce bolo zistiť ako fytochómy ovplyvňujú rast a vývoj rastlín v podmienkach soľného stresu. K tomuto účelu bol využitý genetický prístup spočívajúci v analýze mutantov. V prípade tejto bakalárskej práce boli počas experimentu použité mutantné rastliny *tril*, *fril* a *au^w*, ktoré sú defektné v génoch pre fotoreceptory fytochrómy. Mutanti boli vystavené odlišným koncentráciám NaCl a odlišným svetelným podmienkam (modré a červené a tma).

Vo všeobecnosti analýza mutovaných rastlín potvrdila, že použité experimentálne genotypy *tril*, *fril* a *au^w* boli naozaj fotomorfogénne mutanty, pretože hypokotyly i korene vykazovali v porovnaní s ich odpovedajúcimi kultivarmi (cv. GT, cv. MM, cv. MM(LA2706)) podstatne zníženou citlivosťou k modrému a predovšetkým červenému svetlu. Konkrétne, predlžovací rast hypokotyly mutantov bol inhibovaný svetlom menej než rast hypokotylov odpovedajúcich kultivarov a naopak, rast koreňov všetkých mutovaných rastlín bol stimulovaný svetlom výrazne menej než bolo pozorované u odpovedajúcich kontrolných kultivarov.

Z experimentov je možné vyhodnotiť niekoľko dôležitých záverov. Výsledky odhalili, že modré svetlo zvyšuje toleranciu hypokotyly paradajky k zasoleniu prostredníctvom phyB1. Výsledky ďalej ukázali, že ku zvýšeniu tolerancie k NaCl prispieva rovnako phyA a že phyA sprostredkuje nie len účinok modrého svetla, ale i vplyv vlnových dĺžok svetla červeného.

Je známe, že rast koreňov rastlín je svetlom často stimulovaný. To bolo zistené i v experimentoch tejto bakalárskej práce. Výsledky, ale tak isto odhalili, že rast etiolizovaných koreňov paradajky je inhibovaný vplyvom zasolenia menej než rast koreňov vystavených modrému a červenému svetlu. Analýza mutantov potom potvrdila, že modré i červené svetlo zvyšujú citlivosť koreňa k NaCl prostredníctvom phyB1 i prostredníctvom phyA. To potvrdila i analýza mutantu *au^w*, ktorý má defekt v syntéze chromofóru.

Výsledky bakalárskej práce potvrdili existenciu a funkciu fotoreceptorov vo vplyve na účinky abiotických stresov, konkrétne zasolením. Pre ďalšie porozumenie úlohy signalizačnej dráhy fytochrómov v tolerancii rastlín k abiotickým stresom by bolo vhodné pokračovať ďalšími experimentami na molekulárnej úrovni. Ďalší výskum je možný založiť napr. na sledovaní expresie génov, ktoré sú zapojené v odpovediach rastlín k zasoleniu a to

u fotomorfogénnych mutantov a v závislosti na svetelných podmienkach. Z moderných metód by sme mohli využiť napr. transkriptomovú analýzu (sekvenovanie mRNA). Na to by potom naväzovalo overovanie expresie kandidátnych génov napr. metódou kvantitatívnej PCR. Následne je možné experimenty založiť na sledovaní i množstva produktov (proteínov), ktoré tieto gény kódujú, napr. pomocou metódy western blotovania, kde sa využíva protilátka pre príslušné proteíny.

7 Citovaná literatura

- Briggs W., Christie J. 2002.** Phototropins 1 and 2: versatile plant blue-light receptors, Trends in Plant Science 7, 204- 210
- Briggs W., Olney M. 2001.** Photoreceptors in plant photomorphogenesis to date. five phytochromes, two cryptochromes, one phototropin, and one superchrome. Plant Physiology 125, 85-88
- Butler W. 1973.** Primary photochemistry of photosystem II of photosynthesis, Accounts of Chemical Research, 6, 177-184
- Cao K., Yu J., Xu D., Ai K., Bao E., Zou Z. 2018.** Exposure to lower red to far-red light ratios improve tomato tolerance to salt stress, BMC Plant Biology 18, 92-101
- Carillo P., Annunziata M., Pontecorvo G., Fuggi A., Woodrow P. 2011.** Salinity stress and salt tolerance, Abiotic stress in Plants- Mechanism and Adaptations, Edited by Karum A. and Venkateswarlu B., InTechopen, ISBN 978-953-307-394-1
- Carvalho R., Campos M., Azevedo R. 2011.** The Role of Phytochrome in Stress Tolerance, Journal of Integrative Plant Biology, 53, 920–929
- Christie J., Swartz T., Bogomolni R., Brigg W. 2002.** Phototropin LOV domains exhibit distinct roles in regulating photoreceptor function, The Plant Journal 32, 205–21
- Ćosić M., Vujičić M., Sabovljević M., Sabovljević D., 2018.** What do we know about salt stress in bryophytes?, Plant Biosystems - An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology 9, 51-60
- Consentino L., Lambert S., Martino C., Jourdan N., Bouchet P., Witzak J., Castello P., El-Esawi M., Corbineau F., D’Harlingue A., Ahmad M. 2015.** Blue-light dependent reactive oxygen species formation by *Arabidopsis* cryptochrome may define a novel evolutionarily conserved signaling mechanism, New Phytologist 206, 1450–1462
- Cosgrove D. 1994.** Photomodulation of growth, In: R.E. Kendrick & G.H.M. Kronenberg (eds.), Photomorphogenesis in Plants - 2nd Edition, 631-658
- Cramer G., Urano K., Delrot S., Pezzotti M. and Shinozaki K. 2011.** Effects of abiotic stress on plants: a systems biology perspective. BMC Plant Biology 11, 163-176
- Darwin C. 1881.** The power of movement in plants, D. Appleton and company, New York
- D’Amico-Damião V. and Carvalho R. 2018.** Cryptochrome-related abiotic stress responses in plants, Frontiers in Plant Science 9, 1897-1905

- Dodd A., Salathia N., Hall A., Ke'vei E., To'th R., Nagy F., Hibberd J., Butler A., Webb A. 2005.** Photosynthesis, growth, Survival, and competitive advantage, *Science* 309, 630-633
- Fantini E., Sullib M., Zhange L., Aprea G., Jiménez-Gómezd J., Bendahmanee A., Perrottaa G., Giulianob G. and Facella P. 2018.** Roles of cryptochromes in tomato development, *Plant Physiology*, 21, 732-748
- Fellner M. 2018.** Role of blue light receptors in tolerance of seed germination to salt and osmotic stress, *VISCEA, Plant Abiotics Stress Tolerance V*, Vienna Austria
- Fellner M., Sawhney V. 2002.** The 7B-1 mutant in tomato shows blue light specific resistance to osmotic stress and abscisic acid, *Planta* 214, 675- 682
- Folta K. and Spalding E. 2001.** Unexpected roles for cryptochrome 2 and phototropin revealed by high-resolution analysis of blue light-mediated hypocotyl growth inhibition, *The Plant Journal* 26, 471- 478
- Gao Y., Jiang W., Dai Y., Xiao N., Zhang C., Li H., Lu Y., Wu M., Tao X., Deng D., Chen J. 2015.** A maize phytochrome-interacting factor 3 improves drought and salt stress tolerance in rice, *Springer Science Business coMedia Dordrecht*
- Huala E., Oeller P., Liscum E., Han I., Larsen E., Briggs W. 1997.** *Arabidopsis* NPH1: a protein kinase with a putative redox-sensing domain, *Science* 278, 2120- 2123
- Cha J., Kim J., Kim T., Zeng Q., Wang L., Yeol Lee S., Kim W. & Somers D. 2017.** GIGANTEA is a co-chaperone which facilitates maturation of ZEITLUPE in the *Arabidopsis* circadian clock, *Nature Communications* 8, 3-15
- Christie J., Reymond P., Powell G., Bernasconi P., Raibekas A., Liscum E., Briggs W. 1998.** *Arabidopsis* NPH1: A flavoprotein with the Pproperties of a photoreceptor for phototropism, *Science* 282, 1698- 1701
- Indorf M., Cordero J., Neuhaus G., Rodri'guez-Franco M. 2007.** Salt tolerance (STO), a stress-related protein, has a major role in light signalling, *The Plant Journal* 51, 563–574
- Jones R., Ougham H., Thomas H., Waaland S. 2013.** *The Molecular Life of Plants*, Wiley-Blackwell A. John & Sons, Limited Publication, 534–582
- Josse E., Halliday K. 2008.** Skotomorphogenesis: The Dark Side of Light Signalling, *Current Biology* 18, 1144–1146
- Kami C., Lorrain S., Hornitschek P. and Fankhauser C. 2010.** Light-regulated plant growth and development current topics in developmental biology, Volume 9, 29- 66

- Kendrick R., Kerckhoffs L., Pundsnesl A., Van Tuinen A., Koornneef M., Nagatani A., Terry M., Tretyn A., Cordonnier-Pratt M., Hauser B. & Pratt L. 1997.** Photomorphogenic mutants of tomato, *Euphytica* 79, 227-235
- Kendrick, R., Kronenberg, G. 1994.** Photomorphogenesis in plants, 2nd edition, Springer Science Business Media, SBN 978-0-7923-2551-2
- Kerckhoffs, L., Sengers M., Kendrick R. 1997.** Growth analysis of wild-type and photomorphogenic-mutant tomato plants. *Physiol. Plant.* 99, 309-315
- Kim W., Fujiwara S., Suh S., Kim J., Kim Y., Han L., David K., Putterill J., Nam H., Somers D. 2007.** ZEITLUPE is a circadian photoreceptor stabilized by GIGANTEA in blue light, *Nature*, 449, 356–60
- Komatsu A., Terai M., Ishizaki K., Suetsugu M., Tsuboi H., Nishihama R., Yamato K., Wada M. and Kohchi T. 2014.** Phototropin encoded by a single-copy gene mediates chloroplast photorelocation movements in the liverwort *marchantia polymorpha*, *Plant Physiology*, 166, 411–427
- Kong S., Wada M. 2016.** Molecular basis of chloroplast photorelocation movement, *Journal Plant Research* 129, 159–166
- Koornneef M., Cone J., Dekens R., O'Herne-Robers E., Spruit C., Kendrick R. 1985.** Photo morphogenic responses of long hypocotyl mutants of tomato, *Plant Physiology* 120, 153-165
- Legris M., Çaka Ince Y. & Fankhauser C. 2019.** Molecular mechanisms underlying phytochromecontrolled morphogenesis in plants, *Journal Molecural Science*, 20, 3450- 3465
- Li F., Rothfels C., Melkonian M., Villarreal J., Stevenson D., Graham S., Wong G., Mathews S., Pryer K. 2015.** The origin and evolution of phototropins, *Frontiers in Plant Science* 6, 637-648
- Li J., Li G., Wang H., Wang Deng X. 2011.** Phytochrome signaling mechanisms, *The Arabidopsis Book* 9: e0148, doi/ 10.1199/tab.0148.
- Li Q., Yang H. 2007.** Cryptochrome signaling in plants, *Photochemistry and Photobiology*, 83, 94–101
- Lin C. 2000.** Plant blue-light receptors, *Trends in Plant Science*, 5, 337- 342
- Lin C. 2002.** Blue light receptors and Signal Transduction, *The Plant Cell*, 207–225
- Lin C. and Todo T. 2005.** The cryptochromes, *Genome Biology* 6, 220-229

- Liu H., Liu B., Zhao C., Pepper M. and Lin C. 2011.** The action mechanisms of plant cryptochromes, *Trends in Plant Science*, 16, 684-691
- Meena K., Sorty A., Bitla U., Choudhary K., Gupta P., Pareek A., Singh D., Prabha R., Sahu P., Gupta V., Singh H., Krishanani K. and Minhas P. 2017.** Abiotic stress responses and microbe-mediated mitigation in plants: The omics strategies, *Frontiers in Plant Science* 8, 172-195
- Morelli G. and Ruberti I. 2002.** Light and shade in the photocontrol of Arabidopsis growth, *Trends in Plant Science* 7, 399- 404
- Munns R., Schachtman D. and Condon A. 1995.** The Significance of a two-phase growth response to salinity in wheat and barley, *Plant Physiology*, 22, 561-569
- Murasnige T. and Skoog F. 1962.** A revised medium for rapid growth and bio assays with tohaoco tissue cultures, *Physiologia Plantarum* 15, 473- 497
- Möglich A., Yang X., Ayers R. and Moffa K. 2010.** Structure and function of plant photoreceptors, *Annu. Rev. Plant Biology* 61, 21–47
- Naznin T., Lefsrud M., Gravel V. and Azad M. 2019.** Bluer light added with ed LEDs enhance growth characteristics, pigments content, and antioxidant capacity in lettuce, spinach, kale, basil, and sweet pepper in a controlled environment, *Plants* 8, 93-105
- Parida A., Das A. 2005.** Salt tolerance and salinity effects on plants: a review, *Ecotoxicology and Environmental Safety* 60, 324–349
- Park H., Kim W., Yun D., 2016.** A new insight of salt stress signaling in plant, *Molecular Cells* 39, 447-459
- Peleg Z. and Blumwald E.. 2011.** Hormone balance and abiotic stress tolerance in crop plants, *Current Opinion in Plant Biology* 14, 290–295
- Procházka S., Macháčková I., Krehule J., Šebánek J. 1998.** *Fyziologie rostlin*, Praha: Academia, ISBN 80-200-0586-2
- Rockwell N., Su Y. and Lagarias J. 2006.** Phytochrome structure and signaling mechanisms, *Annual Review Plant Biology*, 57, 837–858
- Shinkle J. 2008.** Basic photomorphogenesis, *Photobiology. Info*, stiahnuté 27.2. 2020
- Somers D., Kim W. and Geng R. 2004.** The F-box protein ZEITLUPE confers dosage-dependent control on the circadian clock, Photomorphogenesis, and Flowering Time, *The Plant Cell*, 16, 769–782
- Taiz L., Zeiger E. 2010.** *Plant physiology*, 3rd edition, Sunderland, Sinauren Associates, Inc., Publisher, ISBN 0-87893-823-0

- Terry M. 1997.** Phytochrome chromophore-deficient mutants, *Plant, Cell and Environment* 20, 740-745
- Terry M., Kendrick R. 1996.** The *aurea* and *yellow-green-2* mutants of tomato are deficient in phytochrome chromophore synthesis, *The Journal of Biological Chemistry* 271, 21681–21686e
- Tripathi S., Hoang Q., Han Y. and Kim J. 2019.** Regulation of photomorphogenic development by plant phytochromes, *Internacional Journal Molecular Science* 20, 6165- 6182
- Van Tuinen A., Hanhart C., Kerckhoffs H., Nagatani A., Boylan M., Quail P., Kendrick D., Koornneef M. 1996.** Analysis of phytochrome-deficient *yellow-green-2* and *aurea* mutants of tomato, *Plant Journal* 9, 173-182
- Van Tuinen A., Kerckhoffs H., Nagatani A., Kendrick R. and Koornneef M. 1995.** A temporarily red light-insensitive mutant of tomato lacks a light-stable, B-like phytochrome, *Plant Physiology* 108, 939-947
- Van Tuinen A., Kerckhoffs L., Nagatani A., Kendrick R., Koornneef M. 1995.** Far-red light-insensitive, phytochrome A-deficient mutants of tomato, *Molecular Genomics and Genetics* 246,133-141
- Wang X., Liu Z., He Y., 2008.** Responses and tolerance to salt stress in bryophytes, *Plant Signaling & Behavior* 3, 516-518
- Xu P., Xiang Y., Zhu H., Xu H., Zhang Z., Zhang C., Zhang L. and Ma Z. 2009.** Wheat cryptochromes: subcellular localization and involvement in photomorphogenesis and osmotic stress responses, *Plant Physiology* 149, 760–774
- Yamauchi S., Takemiya A., Sakamoto T., Kurata T., Tsutsumi T., Kinoshita T. and Shimazaki K. 2016.** The plasma membrane H⁺-ATPase AHA1 plays a major role in stomatal opening in response to blue light. *Plant Physiology* 171, 2731–2743
- Zhu J. 2016.** Abiotic stress signaling and responses in plants, *Cell* 167, 313-324

8 Zoznam použitých skratiek

- ABA (*abscisic acid*) - kyselina abscisová
- B (*blue light*)- modré svetlo
- BV biliverdín
- CRY kryptochróm
- D (*dark*)- tma
- FAD flavínadenínindinukleotid
- FMN flavínmononukleotid
- FR (*far-red*) - dlhovlnné červené svetlo
- GA giberelín
- GI gigantea
- HO hemoxygenáza
- IAA (*Indole-3-acetic acid*) - kyselina indol-3-octová
- JA (*jasmonic acid*) – kyselina jasmonová
- LOV (*light-oxygen-voltage*)
- MS médium - Murashige a Skoog médium
- MTHF (*methenyltetrahydrofolate*) - pterin
- Pfr (*phytochrome far-red*) - forma absorbujúca dlhovlnné červené svetlo
- PHOT (*phototropin*) - phototropín
- phy (*Phytochrome*) - fytochróm
- PIF3 (*Phytochrome interactin factor*) - fytochróm interagujúci faktor 3
- Pr (*Phytochrome red*) - forma absorbujúca červené svetlo
- P ϕ B 3Z-phytochrómbilín
- R (*red light*) - červené svetlo
- RNS (*reactive nitrogen species*) - reaktívne dusikaté formy
- ROS (*reactive oxygen species*) - reaktívne kyslíkaté formy
- SCF Skpl- Cullin- F-box
- Ser/Thr serín/threonín
- SOS salt overly sensitive
- STO salt tolerance
- UV-A ultrafialové svetlo
- WT(*wild-type*) - divoký typ, štandardný typ
- ZTL zeitlupe